



Faculté d'Ingénierie biologique, agronomique et environnementale
Earth and Life Institute ELIM
Unité de Microbiologie - Mycothèque

Evaluation *in vitro* du potentiel bioprotecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate

Louvain-la-Neuve : Août 2012



Promoteur : Prof. Stéphane Declerck
Co-promoteur : Hervé Dupré de Boulois
Maître de Stage : Marie Chave



Mémoire présenté par Sébastien Pierre en vue de l'obtention du diplôme de bio-ingénieur en chimie

Année académique 2011/2012

Sommaire

Introduction.....	5
I. État de l'art.....	6
A. <i>Ralstonia solanacearum</i>	6
1. Symptômes et épidémiologie.....	6
2. Les différentes méthodes de lutte : avantages et limites	7
B. Les Mycorhizes :	8
C. Impact des CMA sur les organismes pathogènes telluriques.....	11
1. Mécanismes de protection (Harrier and Watson, 2004).....	12
2. Bioprotection des plants de tomates associés aux CMA face à différents agents pathogènes telluriques (excepté <i>R. solanacearum</i>).....	14
3. Bioprotection des CMA contre <i>Ralstonia solanacearum</i>	16
D. Évaluation d'interactions plantes/microorganismes <i>in vitro</i>	16
1. Interactions plantes-CMA <i>in vitro</i> :	16
2. Interactions plantes - micro-organismes bioprotecteurs - agents pathogènes <i>in vitro</i>	18
3. <i>Ralstonia Solanacearum in vitro</i>	19
Matériels et méthodes.....	21
I. Matériel biologique :	21
A. <i>Rhizophagus irregularis</i> :	21
B. <i>Solanum lycopersicum</i>	22
C. <i>Ralstonia solanacearum</i>	22
II. Techniques de culture <i>in vitro</i>	23
A. Préparation du système de culture <i>in vitro</i> HAM-P	23
B. Préparation du système de culture <i>in vitro</i> MDP	24
C. Maintenance des systèmes de culture <i>in vitro</i> HAM-P/MDP (Figure 16)	25
III. Dispositif expérimentaux.....	26
A. 1ère expérience : Colonisation de plants de tomates Heatmaster par <i>Rhizophagus irregularis</i> dans un système de culture <i>in vitro</i> MDP avec <i>Medicago truncatula</i>	26
1. Etablissement de l'association <i>in vitro</i>	26
2. Evaluation de la colonisation racinaire	26
B. 2 ^{ème} expérience : Détermination de la quantité d'inoculum de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rsol) à inoculer sur tomate cv. Heatmaster <i>in vitro</i> afin d'obtenir un flétrissement important des plants de tomates sur une période de 15 jours.	28
1. Méthode d'inoculation de la bactérie <i>R. solanacearum</i>	28

2.	Suivi du développement du flétrissement bactérien selon l'échelle de He (He, 1983) (index de flétrissement) et selon le pourcentage de plantes flétries (PWP)(Deberdt et al., 2012).....	28
C.	3 ^{ème} expérience : Évaluation <i>in vitro</i> du potentiel bioprotecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate	30
1.	Suivi du développement du flétrissement bactérien grâce à l'échelle de He (1983) (Disease index) et du nombre de plantes flétries (PWP).....	32
2.	Analyse enzymatique	32
IV.	Analyse Statistiques	32
	Résultats.....	33
I.	1 ^{ère} expérience : Colonisation de plants de tomates Heatmaster par <i>Rhizophagus irregularis</i> dans un système de culture <i>in vitro</i> MDP avec <i>Medicago truncatula</i>	33
II.	2 ^{ème} expérience : Détermination de la quantité d'inoculum de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rsol) à inoculer sur tomate cv. Heatmaster <i>in vitro</i> afin d'obtenir un flétrissement important des plants de tomates sur une période de 15 jours	34
III.	3 ^{ème} expérience : Évaluation <i>in vitro</i> du potentiel bioprotecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate	37
	Discussion	42
I.	Récapitulatif	42
II.	1 ^{ère} expérience : Colonisation de plants de tomates Heatmaster par <i>Rhizophagus irregularis</i> dans un système de culture <i>in vitro</i> MDP avec <i>Medicago truncatula</i>	42
III.	2 ^{ème} expérience : Détermination de la quantité d'inoculum de <i>Ralstonia solanacearum</i> (Rsol) à inoculer sur tomate cv. Heatmaster <i>in vitro</i> afin d'obtenir un flétrissement important des plants de tomates sur une période de 15 jours	44
IV.	3 ^{ème} expérience : Évaluation <i>in vitro</i> du potentiel bioprotecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate	45
V.	Méthode d'évaluation : Index de flétrissement (DI) et pourcentage de plantes flétries (PWP) ..	48
	Annexes.....	51
I.	Annexes : Milieu SRM (Modified Strullu Romand).....	51
II.	Annexe : Association entre racine et spores de CMA (Declerck et al., 2012)	53
III.	Annexe : Préparation d'un inoculum titre (Coranson-Beaudu et al., 2010)	57
	Références bibliographiques.....	61

Tout d'abord, je tiens à remercier le Professeur Stéphane Declerck pour m'avoir permis de réaliser ce mémoire, pour ses corrections et ses conseils constructifs tout au long de l'année. Je remercie également tout particulièrement Marie Chave pour son encadrement lors de ma venue au PRAM, pour sa disponibilité, ses conseils de rédaction et ses nombreuses corrections.

Mes remerciements s'adressent également à tous les membres de l'unité de mycologie, pour leur accueil et en particulier à François qui m'a initié aux techniques de culture in vitro. J'aimerais aussi remercier l'équipe du PRAM qui m'a accueilli chaleureusement pendant trois mois. En particulier, j'aimerais remercier les stagiaires, les VAT et les jeunes chercheurs du PRAM qui m'ont fait découvrir la Martinique. J'aimerais aussi remercier Penina Deberdt et Régine Coranson-Beaudu pour leur aide en microbiologie. Enfin j'aimerais remercier Alain Soler et Régine pour les analyses qu'ils ont réalisées et pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire.

Je remercie Madame Anne Legrève, Monsieur Xavier Draye et Monsieur Hervé Dupré de Boulois d'avoir accepté de faire partie de mon jury de mémoire.

Enfin, je tiens à remercier tout particulièrement Marie Quatannens pour m'avoir soutenu et encouragé tout au long de cette année.

Introduction

Maintenir la productivité des cultures par une agriculture qui substitue l'utilisation d'intrants chimiques par la mobilisation de processus biologiques est au cœur des enjeux de la recherche agronomique actuelle. En effet, l'agriculture intensive qui se caractérise par un apport important d'intrants a montré ses limites : pollution des sols et de l'eau, apparition de pathogènes résistants aux pesticides, coût élevé des pesticides, risques pour la santé des agriculteurs ou encore fragilisation des écosystèmes. Des réglementations sont aujourd'hui mises en place pour limiter l'utilisation de ces intrants. L'agriculture se tourne de plus en plus vers une intensification écologique (Griffon, 2010) qui s'appuie sur la favorisation des mécanismes écologiques par des pratiques telles que la rotation culturale, l'association culturale ou encore la lutte biologique.

En particulier, la lutte biologique par l'utilisation de microorganismes bénéfiques est de plus en plus considérée dans les programmes de contrôle des pathogènes telluriques et aériens. Les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) font partie de cette stratégie. Ces champignons du sol forment une association symbiotique avec près de 80 % des espèces végétales. Cette association se traduit par une amélioration de la croissance des plantes et une résistance accrue vis-à-vis de nombreux stress abiotiques et biotiques. Parmi les stress biotiques, une résistance accrue des plantes a été constatée vis-à-vis des champignons, des nématodes et des bactéries phytopathogènes.

Ralstonia solanacearum, une bactérie phytopathogène Gram négative responsable du flétrissement bactérien, est l'une des phyto bactérioses les plus dévastatrices au monde, en particulier dans les zones de production tropicales et subtropicales. En Martinique, en raison de la présence d'une souche émergente particulièrement agressive (Wicker et al., 2007), les pertes de production en culture de tomate peuvent atteindre les 100 % au sein d'une parcelle. La production de tomate est donc particulièrement menacée et l'approvisionnement de l'île se fait essentiellement par des importations. Il est donc indispensable de trouver une solution aux dégâts engendrés par cette bactérie en privilégiant une approche intégrée.

L'objectif de notre mémoire est d'étudier la relation CMA – *R. solanacearum* chez la tomate en conditions strictement *in vitro*. L'expérience principale visant à évaluer le potentiel bioprotecteur des CMA associés aux plants de tomates contre *R. solanacearum* a été réalisée en Martinique. Pour la mettre en place, deux expériences préliminaires ont été réalisées. La première visant à évaluer la dynamique de colonisation des plants de tomates par les CMA (UCL) et la seconde visant à évaluer la quantité d'inoculum de *R. solanacearum* à inoculer sur un plant de tomate *in vitro* pour induire le flétrissement (Martinique). Toutes les expériences avec *R. solanacearum* ont été réalisées au PRAM (Pôle de recherche agronomique et environnementale de la Martinique) en Martinique, car la souche étudiée est un organisme de quarantaine et ne peut donc être exportée.

I. État de l'art

A. *Ralstonia solanacearum*

Ralstonia solanacearum anciennement appelée *Pseudomonas solanacearum*, *Bacillus solanacearum* ou encore *Burkholderia solanacearum* est l'agent responsable du flétrissement bactérien. Cette bactérie Gram négative s'attaque à une très large gamme de plantes. Plus de cinquante familles (Buddenhagen and Kelman, 1964; Elphinstone et al., 2005) y sont sensibles dont les solanacées (tomates, pommes de terre, aubergines...). De par cette large gamme d'hôtes, cette bactérie est responsable de pertes économiques importantes dans les zones tropicales et intertropicales. Malgré les difficultés liées au manque d'information de l'agriculture de subsistance, Elphinstone et al. (2005) ont évalué les pertes économiques annuelles mondiales dues à l'effet de *Ralstonia solanacearum* sur la pomme de terre à 950 millions de dollars.

Depuis quelques années, une souche émergente de *R. solanacearum* a été identifiée en Martinique sur la tomate et l'aubergine (Wicker et al., 2009). Elle fait partie de la sous-espèce de phylotype II seq4NPB (Wicker et al., 2007). Lors de mon stage, les expériences ont été réalisées avec cette nouvelle souche face à laquelle aucune source de résistance génétique n'a encore été identifiée. Même la variété de tomate Heatmaster présentant une résistance naturelle à *Ralstonia* sp. ne peut survivre avec la sous-espèce seq4NP (Wicker et al., 2007). Cette variété de tomates cultivée dans les climats chauds est connue pour présenter une résistance aux nématodes racinaire et à différentes maladies (flétrissement bactérien, mosaïque du tabac, Fusariose, verticilliose). Elle doit être cultivée dans des sols riches en matière organique. Un sol meuble et bien aéré est préférable puisqu'elle est sensible à l'asphyxie racinaire (martinique, 2007). Des mycorhizes ont déjà été observés sur la variété Heatmaster en champs. Par contre, elle mycorhize moins bien que les oignons pays et la crotalaire (Fernandes et al., 2012).

1. Symptômes et épidémiologie

De nombreux signes extérieurs caractérisent une plante infectée par cette bactérie flétrissante (Hayward, 1991). Comme son nom l'indique, on peut apercevoir un flétrissement des plus jeunes feuilles 5 à 10 jours après l'infection. Quelques jours après avoir observé les premiers symptômes, la plante continue à dépérir de manière irréversible jusqu'à la mort (Figure 1)(Hayward, 1991). Des retards de croissance peuvent aussi être observés chez les plantes hôtes. *R. solanacearum* infecte le cortex des plantes hôtes par les blessures au niveau des racines. Ensuite, elle colonise les vaisseaux du xylème et remonte dans l'entièreté de la plante menant ainsi à une infection systémique. Cette bactérie tellurique se dissémine par de nombreux moyens aussi bien au niveau local, régional qu'international. Au niveau local, l'eau sous forme de fortes pluies, d'éclaboussures ou encore d'irrigation est le principal vecteur de dispersion de *R. Solanacearum*. Notons aussi que la



Figure 1 : Plant de tomate atteint par *R. solanacearum*

contamination peut se réaliser de plantes à plantes par les racines suffisamment proches ou encore par différentes blessures infligées à la plante (parasites, insectes, pratiques culturales). La contamination de matériel végétal ou agricole peut entraîner, quant à elle, une inoculation et une dissémination de la bactérie à une échelle plus large.

2. Les différentes méthodes de lutte : avantages et limites

À cause de sa facilité de dissémination, de son pouvoir hautement pathogène et de son spectre d'hôtes très large comprenant de nombreuses espèces d'importances alimentaires, *R. solanacearum* est un pathogène indispensable à contrôler. De nombreux moyens de lutte sont utilisés, mais pour l'instant aucun d'eux n'est pleinement efficace. Pour cette raison, la stratégie s'oriente vers une protection intégrée utilisant différents moyens de lutte repris ci-dessous.

a) Lutte génétique : Variétés résistantes

L'utilisation de variétés résistantes pour le contrôle de *R. Solanacearum* est pour le moment une des méthodes les plus utilisées. De nombreuses variétés (Dalal et al., 1999) chez les aubergines (Quezado-Soares, 1997), les poivrons (narval(Ano et al., 2002)), les tomates (Caraïbo, Caracoli, Calinago (Ano et al., 2002)), les arachides ou encore le tabac ont prouvé leur efficacité, mais dans des conditions environnementales précises. Par contre, vu le nombre élevé de races et de souches de ce pathogène, les plantes ne sont résistantes que pour de faibles laps de temps. Il existe aussi un risque lié à ces plantes résistantes qui peuvent porter le pathogène sans l'exprimer et donc le disséminer à travers le monde.

b) Prophylaxie

Vu les nombreuses difficultés pour gérer *R. solanacearum*, il faut en premier lieu prévenir son apparition et son développement. Pour ce faire, il faut utiliser des semences saines, désinfecter les outils agricoles ou encore drainer les eaux d'irrigation.

c) Lutte « culturale »

De bonnes pratiques culturales permettent de freiner le développement des maladies liées aux bactéries. Par exemple, arracher et détruire des plantes contaminées ou encore éviter de blesser les plantes lors de leur culture. Dans le cas de *R. solanacearum*, de nombreuses études (Adhikari and Basnyat, 1998; Michel et al., 1996; Sharma and Kumar, 2004) ont montré que l'alternance de cultures commerciales non hôtes a un effet bénéfique sur l'assainissement du sol. Par contre, l'effet de ces rotations n'est pas très important et doit s'étaler sur de nombreuses années. L'alternative à ce type de rotation est l'utilisation de plantes de services n'ayant pas d'intérêts commerciaux, mais seulement un rôle assainissant. Les meilleurs résultats sont obtenus à l'aide de ces plantes dites de services qui sont enfouies partiellement ou totalement. Par exemple, les plantes riches en glucosinolates¹ peuvent être plantées en alternance pour être utilisées pour la biofumigation (Michel et al., 2007). Le glucosinolate va se décomposer en molécules volatiles qui seront toxiques pour certains organismes du sol.

L'association culturale au sein d'une même parcelle peut aussi diminuer le développement des bactéries telluriques. Ces plantes associées non hôtes du pathogène permettront une séparation physique entre les plantes hôtes et diminueront ainsi la propagation de la bactérie. Il est aussi

¹ « Les glucosinolates sont les principaux **métabolites secondaires contenant du soufre** que l'on retrouve dans les **plantes de la famille des brassicaceae** ». http://www.coda-cerva.be/index.php?option=com_content&view=article&id=212&Itemid=303&lang=fr

intéressant d'utiliser des plantes associées qui créeront une barrière allélopathique² grâce à leurs exsudats racinaires. Une étude (Terblanche et al., 2007) portant sur les plants de tabac associés à l'œillet d'Inde réalisée en serre montre que la population de *R. Solanacearum* diminue dans une proportion de 1000. Cela démontre le grand intérêt de cette méthode de lutte face à une bactérie tellurique telle que *R. solanacearum* (Yu, 1999).

Une autre façon de protéger les cultures consiste à apporter des amendements organiques sur la parcelle. Cai et al. (2003) ont ainsi démontré que l'ajout d'un fertilisant biologique organique diminuait de moitié l'infection par *R. solanacearum*. Par ailleurs, l'apport d'amendements modifie et stimule l'activité bactérienne du sol. Cela peut aussi entraîner une diminution de la densité des pathogènes du sol (Cai et al., 2003; Cardoso, 2006).

d) Lutte chimique

La lutte chimique est très peu efficace. L'emploi d'antibiotiques n'influence pas significativement la concentration de *R. Solanacearum* (Farag et al., 1982). Le bromure de méthyle utilisé comme fumigant à large spectre pour la stérilisation des sols est efficace, mais son effet destructeur sur la couche d'ozone a conduit à son interdiction dans la plupart des pays. Ce moyen n'est donc pas à privilégier dans la lutte contre *R. solanacearum*.

e) Lutte biologique

La lutte biologique vise à utiliser des organismes antagonistes de bioagresseurs pour contrôler le développement et la dissémination de ces derniers. L'introduction ou la stimulation de ces microorganismes peut s'avérer efficace dans la lutte contre les pathogènes telluriques. Ils agissent de deux façons différentes.

- Des microorganismes antagonistes ou mutants avirulents peuvent être introduits dans le but d'occuper la niche écologique de la souche sauvage. Mais pour l'instant, les souches avirulentes ne sont pas encore assez compétitives et les deux souches vivent ensemble dans la plante avec une prédominance pour la souche sauvage (Pascal and Trigalet, 1994)
- Des microorganismes symbiotiques peuvent aussi être inoculés ou stimulés pour jouer un rôle positif sur la plante. Ils peuvent renforcer les défenses naturelles de la plante, créer une barrière physique, chimique ou encore une combinaison de ces trois possibilités qui permettront à la plante de mieux résister aux pathogènes. Les CMA font partie de ces microorganismes symbiotiques qui peuvent jouer un rôle dans le contrôle des organismes phytopathogènes.

B. Les Mycorhizes :

La symbiose existant entre les racines d'une plante et le mycélium d'un champignon du sol est appelée mycorhize. Cette relation symbiotique se rencontre chez 80 % des espèces végétales (Hopkins and Évrard, 2003b; Madigan et al., 2007; Smith et al., 1997). De ce fait, les mycorhizes ont un intérêt économique important. Il existe deux grandes classes de mycorhizes (Figure 2) : les endomycorhizes et les ectomycorhizes.

² Allélopathie : tout effet direct ou indirect, positif ou négatif, d'une plante (micro-organismes inclus) sur une autre, par le biais de composés biochimiques libérés dans l'environnement (Rice, E. L., 1984, Allelopathy: Orlando, Academic Press.)

Les hyphes des ectomycorhizes forment un manchon externe autour de la racine. Ces hyphes pénètrent aussi à l'intérieur de la racine, mais restent à l'extérieur de la paroi cellulaire. Ce type de mycorhize se retrouve principalement dans certaines familles des régions tempérées (Parniske, 2008) comme les pins (*pinaceae*), les chênes ou encore les hêtres (*Fagaceae*) (Hopkins and Évrard, 2003b; Madigan et al., 2007). Les endomycorhizes comprennent, entre autres, les mycorhizes « orchid » (avec les orchidées), « ericoid » (avec la famille des *Ericaceae*) et à arbuscule (CMA) (avec la plupart des autres plantes terrestres) (Hopkins and Évrard, 2003b; Madigan et al., 2007; Parniske, 2008).

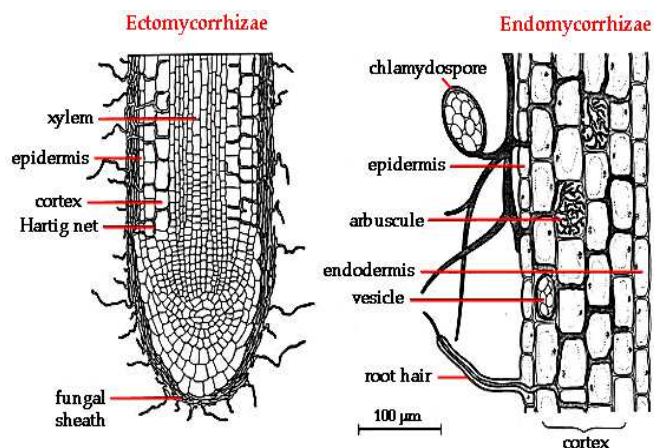


Figure 2: comparaison entre endo et ectomycorhizes

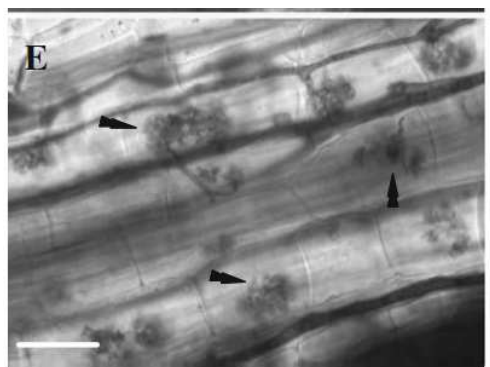
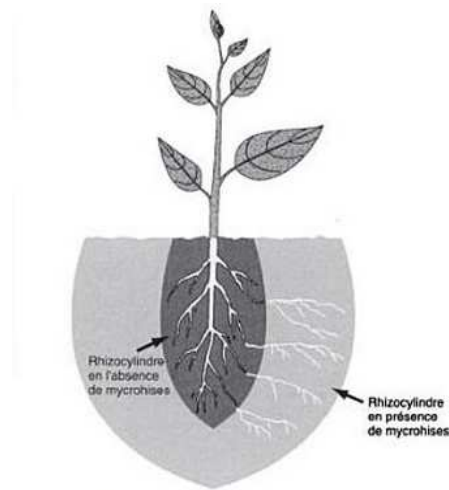


Figure 3 : Photo des arbuscules formées par les CMA (Voets et al., 2009)

Dans le reste du travail, je me focaliserai sur les champignons mycorhiziens à arbuscules (CMA) (Figure 3). L'intérêt de leur étude s'explique par le fait qu'ils colonisent 80 % des plantes terrestres (Smith et al., 1997). Les hyphes des CMA, contrairement à ceux des ectomycorhizes, pénètrent à l'intérieur de la paroi des cellules corticales, mais elles ne percent pas la membrane plasmique. Les invaginations formées par les endomycorhizes appelées arbuscules permettent d'augmenter considérablement la surface d'échange entre le champignon et la plante au niveau de la membrane plasmique (Hopkins and Évrard, 2003b; Madigan et al., 2007). Le réseau d'hyphes des CMA est dense (ex. plus de 100 mètres d'hyphes par cm³ de sol ont été rapportés (Miller et al., 1995) et s'étend au-delà de la zone de prospection du système racinaire de la plante (Figure 4). Ce mycélium joue ainsi un rôle important dans le prélèvement et le transport des minéraux (principalement le phosphore) et de l'eau du sol vers la plante (Finlay, 2007; Madigan et al., 2007). Tous les minéraux captés par le mycélium extraracinaire passent donc dans le mycélium intraracinaire et sont échangés avec la plante au niveau des arbuscules. En contrepartie, la plante fournit au CMA des composés carbonés issus de la photosynthèse, indispensable à son cycle de vie (al; Bago et al.; Solaiman and Saito, 1997). Il existe aussi une corrélation entre l'augmentation de la croissance des plantes associées aux CMA et l'appauvrissement du sol en nutriments, plus particulièrement pauvre en phosphore. À l'inverse, la fertilisation avec du phosphore réduit la colonisation de la racine par les CMA et donc la croissance de la plante (Rajapakse et al., 1989).

Les CMA nous intéressent particulièrement puisqu'ils augmentent la résistance des plantes à certains pathogènes du sol (Sikes et al., 2009) (Liu et al., 2007) et à différents stress abiotiques. La résistance à de nombreux stress s'explique grâce au meilleur développement de la plante, à

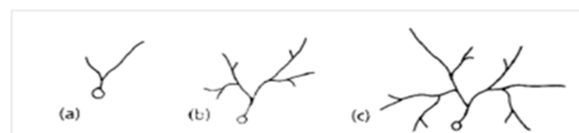
l'augmentation de sa biomasse et de sa surface racinaire, à l'apport plus important de nutriments, à l'augmentation de la photosynthèse et aussi à des modifications systémiques (partitionnement du carbone dans la plante et accumulation d'acide aminé) (Madigan et al., 2007; Schellenbaum et al., 1998).



**Figure 4 : Zone gris foncé : sol disponible pour la plante sans mycorhize.
Zone gris clair : sol disponible pour la plante avec mycorhize(Hopkins and Évrard, 2003a)**

Les CMA sont formés uniquement par des champignons de la division des Glomérormycètes. Ceux-ci sont apparus il y a plus de 400 millions d'années (Redecker et al., 2000; Remy et al., 1994) et auraient joué un rôle dans la colonisation du milieu terrestre par les plantes (Smith and Read, 2008). Il en existe 5 genres : *Claroideoglomus*, *Funneliformis*, *Glomus*, *Rhizophagus*, *Sclerocystis* (Schüßler and Walker, 29 mai, 2012). Les Glomérormycètes, précédemment classés dans la famille des Zygomycètes, se distinguent tout comme ces derniers par l'absence de septum dans les hyphes. Les autres caractéristiques pour reconnaître des Glomérormycètes sont de longs hyphes avec peu de ramifications, la présence d'anastomoses³ et la présence de multiples noyaux (Declerck, 2011). La reproduction des Glomérormycètes semble uniquement asexuée. La croissance des hyphes est expliquée sur le schéma de la Figure 5 extrait du cours de Morphologie et Physiologie des Mycètes donnée par Mr Declerck à l'UCL. L'établissement d'un réseau mycélien dense ne peut se réaliser qu'en présence d'une plante hôte.

Figure 5: (a) Germination d'une spore. (b), (c) croissance apicale et ramification. (Declerck, 2011)



³Anastomose : « Fusion entre branches du même ou de différents hyphes qui abouti au développement de réseaux mycéliens denses » (Declerck, S., 2011, Cours de Morphologie et Physiologie des Mycètes, LBI01213.

Les mycorhizes jouent aussi un rôle important dans la stabilisation des agrégats du sol en modifiant l'environnement rhizosphérique. L'agrégation des sols par les CMA est due à l'exsudation racinaire et en particulier à la sécrétion de glomaline⁴ (Violi et al., 2007; Wright et al., 1999) .

Selon de nombreuses études, les CMA ont une faible spécificité pour les plantes hôtes (Smith and Read, 2008) et peuvent coloniser en même temps plusieurs espèces de plantes différentes à des stades de développement différents (Newman, 1988; van der Heijden et al., 2008)

Mais ces études menées sur la spécificité sont basées sur des expériences réalisées en conditions contrôlées en absence de compétitivité. Alors que dans un écosystème donné, la diversité des espèces de plantes et de CMA est corrélée l'une avec l'autre et influence directement cet écosystème (Maherali and Klironomos, 2007; Rosendahl and Stukenbrock, 2004; Vandenkoornhuyse et al., 2003).

La souche de CMA utilisées dans cette expérience est *Rhizophagus irregularis* ((Blaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler). Ce champignon produit principalement des agrégats de spores (de couleur vitreuse à jaune) pâles à l'intérieur des racines ou dans le sol. Les spores sont ovoïdes, oblongues ou irrégulières (60–130 × 80–240 µm) et des dépressions dans la paroi cellulaire peuvent se produire (Figure 6)(Blaszkowski et al., 2008).

Pour l'instant, aucune analyse phylogénétique n'a pu montrer de différence du point de vue biologique et morphologique entre les *G. irregularis* et *Glomus intraradices* (Blaszkowski et al., 2008)(Figure 6).

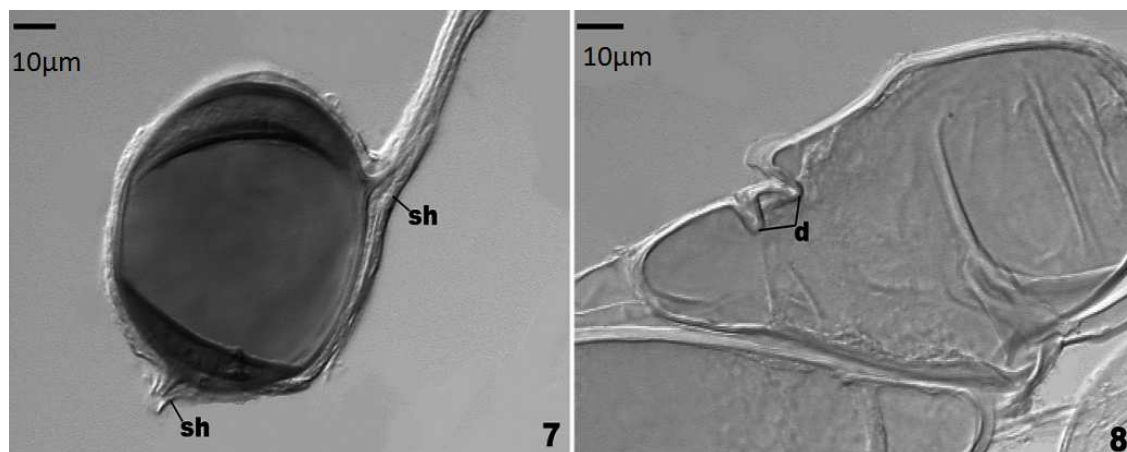


Figure 6: À gauche, une spore de *G. irregularis*. À droite, formation d'une dépression dans la paroi cellulaire (Blaszkowski et al., 2008)

C. Impact des CMA sur les organismes pathogènes telluriques

⁴ Glomaline : Glycoprotéine du sol produit par les CMA jouant un rôle important dans le stockage du carbone dans le sol grâce à son interaction avec les agrégats du sol. (Matthias, C. R., and M. M. T. The University of Montana, 2003, Controls on the production, incorporation and decomposition of glomalin - a novel fungal soil protein important to soil carbon: United States.)

De nombreuses études ont été menées sur le rôle des CMA dans le contrôle des pathogènes telluriques⁵ (Akköprü and Demir, 2005; Bååth and Hayman, 1983; Caron et al., 1985; Fritz et al., 2006; Garcia-Garrido and Ocampo, 1988, 1989; Lioussanne, 2010; Ren et al., 2010). Les résultats obtenus sont directement dépendants des conditions environnementales, des plantes cultivées, des CMA et des pathogènes considérés. Pour essayer de comprendre cette association, Harrier et Watson (2004) ont décrit les différents mécanismes qui pouvaient intervenir lors de la protection de la plante hôte. Il paraît plus vraisemblable que la protection de la plante par cette symbiose passe par une intégration de ces différents mécanismes de lutte plutôt que par un seul mécanisme.

1. Mécanismes de protection (Harrier and Watson, 2004)

a) Amélioration de la nutrition des cultures

Les CMA améliorent le développement des plantes en leur permettant une meilleure assimilation des minéraux du sol. Grâce à ce prélèvement accru et à une augmentation de la biomasse, les plantes peuvent compenser les dommages causés par les pathogènes. Cette amélioration de la résistance à certains pathogènes dépend donc de la nutrition minérale de l'hôte, mais aussi de la fertilité du sol. En particulier, le rôle majeur du phosphore a été mis en évidence dans de nombreuses études (Boedker et al., 1998; Cason et al., 1983; Jaizme-Vega and Pinochet, 1997). Cependant, la disponibilité du phosphore pour la plante n'améliore pas forcément la résistance de la plante vis-à-vis de tous les pathogènes par exemple contre *Fusarium oxysporum* (Jaizme-Vega et al., 1997; Trotta et al., 1996). Cela laisse donc penser que d'autres mécanismes de bioprotection existent.

b) Compétition pour les sites d'infections et de colonisations

Les pathogènes telluriques tels que les nématodes, les champignons ou les bactéries occupent les mêmes tissus racinaires que les CMA. De ce fait, ils sont en compétition directe pour les cellules racinaires lors d'une colonisation simultanée (Smith, 1988). Cordier et al. (1996) ont démontré qu'il existait au niveau local une compétitivité entre les CMA et *Phytophthora parasitica*. Ce pathogène se développe moins dans les zones colonisées par les CMA et aussi dans les zones adjacentes. De plus, ce pathogène n'a jamais été retrouvé dans les cellules contenant des arbuscules (Cordier et al., 1996).

Dans la plupart de ces expériences, les CMA ont été inoculés avant le pathogène mais le potentiel bioprotecteur existe quand même indépendamment du moment d'inoculation (Caron et al., 1986; St-Arnaud et al., 1997). Même si le CMA a un potentiel bioprotecteur, le pathogène peut dans certains cas avoir un effet néfaste sur les CMA en diminuant l'étendue de la colonisation de celui-ci (Bååth and Hayman, 1983; Davis and Menge, 1980). Ceci corrobore l'idée qu'une compétitivité existe entre les différents pathogènes telluriques et les CMA.

c) Altération de la structure de la racine

La colonisation des plantes par les CMA peut entraîner des changements dans les racines de la plante. On observe ainsi une augmentation de la lignification des parois cellulaires (Schwob et al., 1999). Cette lignification plus importante peut ainsi créer une barrière physique empêchant le pathogène de pénétrer au sein de la plante.

⁵ Pathogènes telluriques : pathogènes qui vit dans le sol (lexicales, C. n. d. r. t. e., 2012, Définition Tellurique.)

d) Compétition pour les produits de la photosynthèse

Les CMA sont des organismes symbiotiques obligatoires et de ce fait tirent leur source de carbone de la photosynthèse de leur hôte. La compétition entre un pathogène endoparasitiques (ex. nématode) et le CMA pour cette source de carbone pourrait jouer un rôle important dans le développement de ces deux microorganismes.

e) Influence des CMA sur les exsudats racinaires

Lors de la mycorhization, une grande quantité de carbone est transférée de l'hôte au CMA (Bago et al., 2000). Ce que le CMA va capter sera ensuite principalement relâché dans le sol par respiration (Smith et al., 1997). Bien qu'il existe une modification des exsudats racinaires lors de la colonisation d'une plante par un CMA (Bansal and Mukerji, 1994; Graham et al., 1981; Marschner et al., 1997), aucun lien entre cette modification et la bioprotection de la plante n'a été fait. Le changement qualitatif et quantitatif des exsudats racinaires pourrait altérer les signaux chimotactique pour le pathogène émis par la racine (Dixon et al., 1989; Graham et al., 1981; Marschner et al., 1997). Par contre, les recherches de Lioussanne menée en 2010 ont montré qu'il n'existait pas de lien entre le potentiel bioprotecteur des CMA *G. mosseae* et *G. intraradices* sur la maladie provoquée par (*Phytophthora nicotianae* et les exsudats racinaires. Des études complémentaires devraient être réalisées avec d'autres associations hôtes-CMA-pathogènes pour pouvoir tirer des conclusions sur ce mécanisme de défense.

f) Changement dans la microflore du sol

La bioprotection du CMA sur la plante peut aussi venir de la modification de la communauté bactérienne du sol. En effet, les interactions synergiques entre les CMA et les PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria)⁶ peuvent avoir un effet néfaste sur les pathogènes telluriques (Diedhiou et al., 2003). Les mécanismes de protection des PGPR sont bien connus et multiples : modifications des disponibilités en Fe et Mn, compétition pour l'espace et les nutriments, libération de CHN ou d'antibiotique, stimulation des mécanismes de défense de la plante... (Azcon et al., 1996; Bowen and Rovira, 1999; Larkin and Fravel, 1999; Nehl and Allen, 1997). Ce moyen de lutte est un des plus prometteurs pour le contrôle des pathogènes dans le sol.

g) Activation des mécanismes de défense de la plante

Les CMA peuvent stimuler les moyens de défense de la plante de manière systémique ou locale. Comme vue précédemment, une augmentation locale de la concentration en métabolite phénolique dans les racines de la plante induit une augmentation de la lignification et forme ainsi une barrière physique vis-à-vis du pathogène (Morandi, 1996). La défense peut aussi être systémique et induit une modification (activer ou stimuler) de voies métaboliques qui mènent à une résistance plus importante lors de « l'attaque » du parasite (Cordier et al., 1998; Liu et al., 2007; Pozo and Azcón-Aguilar, 2007; Pozo et al., 1996). Notons par exemple l'accumulation de protéines PR-1 (ayant un rôle dans la défense des pathogènes) dans les tissus infectés par *Phytophthora parasitica* ou la formation de structures « comme des papilles » composées de pectine non estérifiée et de callose entourant le pathogène dans les racines (Cordier et al., 1998; Pozo et al., 2002). La symbiose entre le CMA et la plante peut aussi prédisposer la plante à réagir plus rapidement en cas d'infection du pathogène (Azcon Aguilar and Barea, 1996; Caron, 1989). En fait, le système immunitaire de la plante

⁶ PGPR : Bactéries de la rhizosphère ayant un effet positif sur le développement et la bonne santé de la plante. (Kloepper, J. W., and M. N. Schroth, Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, p. 879-882.)

est étroitement contrôlé entre l'étape présymbiotique et l'établissement de la symbiose fonctionnelle (Jung et al., 2012). L'activation de ces mécanismes de défense passe par une modification de l'expression de certains gènes. L'expression de ces gènes est régulée par des « signaux d'alarme » induisant telle ou telle voie métabolique (De Vos et al., 2005). En particulier, l'augmentation de l'expression des gènes de régulation du jasmonate jouerait un rôle important dans l'induction des défenses immunitaires (Pozo et al., 2009) de la plante au niveau racinaire et foliaire (Pozo et al., 2010).

2. Bioprotection des plants de tomates associés aux CMA face à différents agents pathogènes telluriques (excepté *R. solanacearum*).

a) *Pseudomonas syringae*

Cet agent pathogène tellurique est une bactérie Gram négative disposant d'un flagelle comme *R. solanacearum*. Cette bactérie est présente dans de nombreuses zones de production et rend les fruits impropres à la commercialisation (Young et al., 27/06/2012) (Figure 7). Garcia-Garrido et Ocampo (1989) ont testé l'effet de *Glomus mosseae* associé aux plants de tomates contre *P. syringae*. Il en ressort que l'inoculation du CMA mène à une augmentation de la masse de la tige même si le pathogène a été inoculé. D'ailleurs, le pourcentage de mycorhization des plants de tomates ne varie pas en présence de *P. syringae*. Comme ils ont utilisé deux modalités d'inoculation (CMA + pathogènes (en même temps) / CMA + pathogènes (3 semaines plus tard)), ils ont pu observer qu'une préinoculation du CMA augmentait la résistance de la plante face au pathogène. Enfin, le niveau de phosphore dans la tige est modifié suite à l'inoculation du CMA, mais ne l'est pas lors de l'inoculation du pathogène. Le mécanisme de défense évoqué est l'augmentation des nutriments disponibles, mais d'autres mécanismes doivent rentrer en jeu. En effet, l'augmentation des défenses de la plante lors de la préinoculation laisse à penser qu'une modification systémique induite par le champignon (ex. augmentation des phénols) aurait amélioré les défenses de la plante.



Figure 7 : plants de tomates touchés par *Pseudomonas syringae*

b) *Phytophthora nicotianae*

Trotta et al. (2006) ont réalisé une expérience sur le pathogène tellurique *Phytophthora nicotianae* et sur son interaction avec la symbiose CMA/plants de tomates. *P. nicotianae* est un oomycète induisant des nécroses au niveau racinaire (Figure 8). L'expérience de Trotta et al. (2006) s'est basée sur l'analyse racinaire et foliaire de la plante lors de différentes inoculations (CMA, pathogène, CMA + pathogène et témoin). L'analyse montre que *G. mosseae* diminue les



Figure 8 : Nécroses racinaires dues à *Phytophthora nicotianae*

nécroses au niveau des racines (plus de 50 %) et empêche une réduction de croissance induite par le pathogène. Ils ont aussi fait varier les quantités de phosphore pour nourrir les plantes et non pas vu de diminution significative de la maladie entre les deux différentes concentrations. La bioprotection du CMA n'est donc pas liée directement à l'augmentation de phosphore. D'autres mécanismes

doivent rentrer en jeu, mais ceux-ci n'ont pas été mis en avant dans cette expérience. Lioussane et al. (2010) ont montré qu'à priori ce ne sont pas non plus les exsudats racinaires qui interviennent dans le rôle bioprotecteur des CMA.

c) *Verticilium dahliae* et *albo-atrum*

Verticilium dahliae et *albo-atrum* sont des champignons faisant partie de l'embranchement des ascomycètes qui provoquent chez les plantes sensibles un jaunissement des feuilles et un flétrissement dû à une obstruction des tissus conducteurs dans les plantes (Verticilliose) (Figure 9). *Verticilium dahliae* est difficile à contrôler puisque qu'il peut survivre plusieurs années dans le sol (Goicoechea N et al., 2010). Une étude



Figure 9 : plante touchée par *Verticilium dahliae*

(Karagiannidis et al., 2002) réalisée sur les aubergines a montré qu'il existait une résistance face à ce pathogène de plante avec un CMA. Par contre, Bååth et Hayman travaillant sur la tomate et *Verticilium albo-atrum* n'ont pas observé de résistance induite par la mycorhization. Une des raisons avancées est que l'augmentation de la concentration en phosphore induite par le CMA permet au pathogène de mieux se développer (Bååth and Hayman, 1983). En effet, l'augmentation de la concentration de *V. albo-atrum* dans le sol serait la même dans une plante mycorhizée ou dans une plante fertilisée avec du phosphore. Par contre, des expérimentations sur *V. dahliae* réalisées par Goicoechea et al. (2010) sur les concentrations enzymatiques à l'intérieur de la tige et de la racine de plantes de poivrons montrent un pouvoir bioprotecteur des CMA. La réduction des symptômes dans ce cas-ci s'expliquerait par une meilleure balance en antioxydant et l'amélioration de la photosynthèse dans les feuilles. Il a aussi été montré que dans les racines, les CMA induisent des nouvelles isoformes de chitinase acide et de superoxide dismutase. Ces différents effets peuvent intervenir dans la bioprotection contre *V. dahliae*.

d) *Fusarium oxysporum*

Ce champignon ascomycète provoque chez de nombreuses espèces un flétrissement venant de l'envahissement des vaisseaux xylémiens. Beaucoup d'études (Akköprü and Demir, 2005; Caron et al., 1985; Ren et al., 2010) ont montré l'influence positive des CMA sur le management de *F. oxysporum* dans le sol. L'inoculation de CMA permet aussi de diminuer les nécroses racinaires dues à l'infection des plants de tomates par *Fusarium oxysporum*. Ren et al. (2010) ont aussi examiné la concentration en polyphénol oxydase (PPO) dans les racines et dans les feuilles de plants de tomates infectés. L'activité de la PPO liée à la résistance de la plante face aux



Figure 10 : plants de tomates touchés par *Fusarium oxysporum*

attaques des pathogènes (Li and Steffens, 2002) augmente grâce à l'inoculation de CMA et ce même en présence de *F. oxysporum*. Par contre, l'inoculation du pathogène sans celle des CMA diminue l'activité de la PPO. La résistance de la plante mycorhizée viendrait donc ici d'une modification enzymatique induite par le CMA.

3. Bioprotection des CMA contre *Ralstonia solanacearum*

Comme vu précédemment, *Ralstonia solanacearum* (Figure 11) est une bactérie Gram négative qui peut survivre de nombreuses années dans le sol même en absence de cultures (Graham, 1979; van Elsas et al., 2000). Halos et Zorilla (1979) ont montré qu'il existait une diminution de l'infection de *R. solanacearum* quand des plants de tomates étaient colonisés par des CMA. Aucun mécanisme n'a été mis en évidence lors de cette expérimentation. Des études (Halos and Zorillas, 1979; Tahat et al., 2008; Tahat et al., 2010; Zhu and Yao, 2004) ont tenté de comprendre les mécanismes qui interviennent lors de cette bioprotection. Tahat et al. (2008) se sont particulièrement intéressés aux exsudats de plantes myc+ et myc-. Aucune différence n'a été observée entre ces plantes. Le potentiel bioprotecteur des CMA face à *R.*

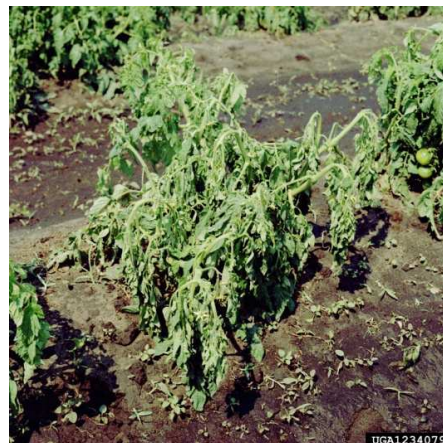


Figure 11 : Plante de tomate touchée par *R. solanacearum*

solanacearum ne résiderait donc pas dans les exsudats racinaires des plantes mycorhizées comme Lioussane et al. (2010) l'ont suggéré pour *P. nicotianae*. Zhu et Yao ont quant à eux réalisé une étude avec un sol autoclavé et des graines désinfectées où ils ont inoculé des CMA provenant de racines de maïs lors de la transplantation. L'inoculation de *R. solanacearum* a été réalisée 4 semaines après la transplantation. Ils ont pu montrer des différences de concentrations en phénol aussi bien au niveau local que systémique dans les racines et les feuilles des plantes inoculées avec des CMA. L'augmentation de la concentration en phénol paraît être un facteur prépondérant de la bioprotection induite par les CMA (Li and Steffens, 2002; Morandi, 1996) contre *R. solanacearum* (Zhu and Yao, 2004). Malgré ces pistes, les mécanismes de défense peuvent difficilement être identifiés, car ils dépendent des conditions expérimentales. Celles-ci sont difficilement reproductibles comme par exemple les interactions avec les micro-organismes du sol ou la pureté des souches de CMA. On peut s'affranchir d'une grande partie de ces éléments en travaillant en conditions *in vitro*.

D. Évaluation d'interactions plantes/microorganismes *in vitro*

Les études reprises ci-dessus ont été réalisées pour la plupart en condition *in vivo*, alors que dans ce mémoire les expériences ont été réalisées en condition *in vitro*.

1. Interactions plantes-CMA *in vitro* :

La culture des organes racinaires (uniquement) *in vitro* s'est développée ces dernières décennies (Butcher and Street, 1964; Tepfer, 1989) permettant ainsi de commencer l'étude des CMA *in vitro*. En particulier, les racines de carottes ont été largement utilisées dans l'association avec les CMA (Bécard and Fortin, 1988; Declerck et al., 2005; Tepfer, 1989). Grâce à cette association avec des racines de plantes, les CMA peuvent compléter leur cycle de vie et être étudiés sous forme de mycorhize *in vitro*. Ce moyen de culture a de nombreux avantages, car il permet de faire de nombreuses observations de manière non destructive. On pourra donc observer la dynamique de développement du CMA (de Souza and Declerck, 2003; Declerck et al., 2001; Declerck et al., 1996),

l'architecture du mycélium (Bago et al., 1998; Voets et al., 2006) ou encore l'ontogenèse⁷ des spores (Dalpé and Declerck, 2002; De Souza et al., 2005; Declerck et al., 2000). L'amélioration de cette technique en deux compartiments séparant le mycélium de la partie racinaire mycorhizée (St-Arnaud et al., 1996) permet en plus l'étude du transport des éléments vers la racine (Dupré de Boulois et al., 2005; Nielsen et al., 2002) et l'analyse de métabolite lipidique (Bago et al., 2002). Cette séparation permet aussi l'isolement et l'identification de souche « pure » de CMA utiles aux analyses moléculaires (Koch et al., 2004).

Malgré ces nombreuses applications, l'utilisation de racines excisées (sans la tige) dans l'étude des mycorhizes présente de nombreuses limitations. En l'absence de tissus photosynthétiques, l'analyse de la balance hormonale et des relations physiologiques comme le transport des minéraux et du carbone de la source vers le puits sont impossibles (Fortin et al., 2002). De plus, l'addition de sucrose dans le milieu de culture remplaçant les carbohydrates produits par la photosynthèse peut modifier les interactions biochimiques entre la plante et le CMA (Fortin et al., 2002). Pour ces nombreuses raisons, il paraît plus intéressant d'analyser un CMA associé à une plante complète (autotrophe) en conditions *in vitro*.

De nombreuses expériences associant un CMA avec l'entièreté d'une plante *in vitro* ont été menées dans les années 80 (Hepper, 1981; Macdonald, 1981; Pons et al., 1982; Strullu and Romand, 1986). Ces associations réalisées dans un liquide ou dans du milieu d'Agar n'ont pas reçu beaucoup d'attention. Cela provient des difficultés d'utilisation et de reproduction de ces systèmes couplés à une limitation quantitative et qualitative des données récoltées sur le développement des partenaires symbiotiques (Voets et al., 2005). Plus tard, un système de culture tripartite (plant de fraise et racine de carottes avec CMA) (Elmeskaoui et al., 1995) et bipartite (fraises et spores de CMA) (Cassells et al., 1996) ont été mis en place. Ces nouveaux systèmes ont permis d'étudier l'effet des stress hydriques (Hernández-Sebastià et al., 1999) et l'effet de la lumière et du CO₂ sur le développement des mycorhizes (Louche-Tessandier et al., 1999). Seulement le système tripartite ne permet pas d'analyse des interactions avec uniquement plante/CMA. Le système bipartite quant à lui empêche l'analyse de l'architecture de la racine de manière non destructive à cause de l'utilisation de mousse de polyuréthane (Dalpé et al., 2005). Des techniques récentes (Dupré de Boulois et al., 2006; Voets et al., 2005) ont développé un moyen de produire de grandes quantités de spores (ex. 12 000 spores en 22 semaines (Voets et al., 2005)) grâce à une association de plantes (pommes de terre (Voets et al., 2006), luzerne (Dupré de Boulois et al., 2006) et de spores de CMA. Seulement ces deux systèmes (HAM-P⁸) prennent plusieurs semaines pour obtenir une plante avec un haut taux de mycorhization. Voets et al. (2009) ont donc essayé de réduire le temps d'installation de la symbiose mycorhizienne de manière homogène. Inspiré d'une étude (Cano et al., 2008) réalisée sur des racines excisées en boîtes de Petri bi-compartmentées. Ils positionnent des spores de CMA avec une plantule de *Medicago truncatula* dans un compartiment de la boîte de Petri bicompartimenté et attendent que la mycorhize se développe (partie donneuse). Quand le mycélium (uniquement) passe dans le deuxième compartiment de la boîte de Petri, on y transfère la plante à mycorhizer. Pour la pomme de terre, la mycorhization (40 à 70 %) se fait après 3 jours. De plus, les vésicules sont observables 6 jours après la transplantation de la plantule de pomme de terre. Ce système (MDP : mycelium donor plant) (Figure 12 (b)) permet donc une bonne mycorhization des plantes en moins

⁷ Ontogenèse : développement d'un organisme depuis sa naissance jusqu'à sa mort

⁸ Half-closed arbuscular mycorrhizal - plant

de 10 jours. Il sera utilisé pour réaliser nos expériences tout comme le système HAM-P décrit ci-dessous.

Le système de culture *in vitro* Half-closed arbuscular mycorrhizal-plant (HAM-P) (Figure 12 (a)) est constitué d'une boîte de Petri de 90 mm de diamètre dans laquelle les racines d'une plante hôte et un CMA sont associés (Voets et al., 2005) alors que la tige se développe en dehors de la boîte à l'air libre.

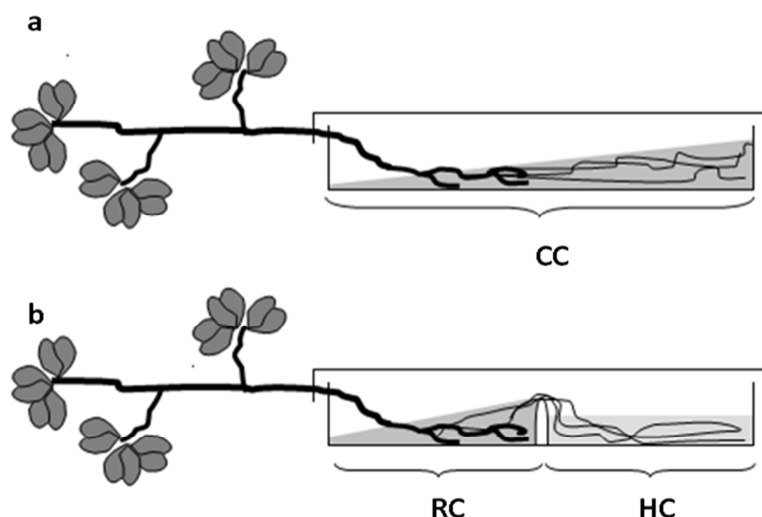


Figure 12 : Systèmes HAM-P en boîtes mono (a) et MDP en boîtes bi-compartmentées (b). (a) Dans la boîte mono-compartmentée les racines et le CMA se développent dans le compartiment de culture (CC). (b) La boîte bi-compartmentée est séparée en deux parties. Dans le compartiment CR (compartiment racinaire), le champignon et la racine se développent alors que dans le CH (compartiment hyphal) seul le mycélium extraracinaire se développe (CESAMM/GINCO, 2012).

Grâce à ce système, on peut obtenir plusieurs milliers de spores (ex : avec *R. irregularis* MUCL43194), un important réseau d'hyphes extraracinaire et une bonne colonisation racinaire (Voets et al., 2005). Ces spores sont viables et aptes à coloniser de nouvelles plantules. Le système de culture *in vitro* HAM-P peut aussi être adapté à une boîte de Petri bi-compartmentée contenant un compartiment racine + CMA (CR) et un compartiment hyphal (CH) (Figure 12).

2. Interactions plantes - micro-organismes bioprotecteurs - agents pathogènes *in vitro*.

Peu d'études mettant en avant l'interaction directe CMA/plante/pathogène ont été menées en condition *in vitro*. Notons cependant le travail de Gallou et al. (2011) qui a évalué le pouvoir bioprotecteur d'un CMA associé à une plantule de pommes de terre contre *Phytophthora infestans*. Le protocole expérimental était repris de la note technique proposée par Voets et al. (2009) décrit ci-dessus. Les résultats de l'expérience (Gallou et al., 2011) montrent une diminution de l'index d'infection foliaire (*P. infestans*) quand le CMA est associé à la plante. Pour l'instant, les autres études évaluant le potentiel bioprotecteur des CMA *in vitro* n'ont pas été réalisées avec une association directe entre la plante et le CMA. Lioussane et al. (2010) tout comme Tahat et al. (2010) ont utilisé les exsudats racinaires de plantes mycorhizées et ont observé leur effet sur différents

pathogènes telluriques. Aucune de ces deux études n'a mis en avant de rôle bioprotecteur des exsudats racinaires.

3. *Ralstonia Solanacearum in vitro*

À notre connaissance, il n'existe aucune étude qui utilise *Ralstonia solanacearum* associé à une plante en condition *in vitro*.

Plusieurs milieux de croissance sont utilisés pour la croissance de *R. solanacearum* en condition *in vitro*. Quand la croissance se fait à partir d'une culture « pure » de *R. solanacearum*, on utilise un milieu non sélectif. On peut aussi prendre un milieu non sélectif si l'on isole la bactérie d'une plante vivante où elle est présente en grande concentration (plante présentant les symptômes). Les deux milieux développés par Kelman (1954) sont le Triphenyl tetrazolium chloride (TZC) et le Casamino acid-Peptide-Glucose (CPG). Sur ces deux milieux, les colonies sont visibles après 48-72h en les incubant à 28 °C. Par contre, la couleur des colonies est différente d'un milieu à l'autre. Pour isoler *R. solanacearum* d'une plante sans symptôme, de l'eau ou d'un échantillon de terre, l'utilisation d'un milieu semi-sélectif est requise. Mais ce milieu n'est pas parfait. Toutes les souches de *R. solanacearum* ne poussent pas et certaines autres bactéries Gram négatives peuvent s'y développer. Malgré cela, l'utilisation du milieu semi-sélectif SMSA (Seiquera Modified South Africa) (Elphinstone et al., 1996) est largement répandue. L'apparition des bactéries se fait après 2 à 5 jours en les incubant à 28 °C. Ici, les colonies de *R. solanacearum* apparaissent fluides et de formes irrégulières avec une coloration blanche sur les côtés et rose au centre (Figure 13). La pureté de la souche n'est pas difficile à obtenir par étalement sur milieu SMSA (Smith et al., 1999).

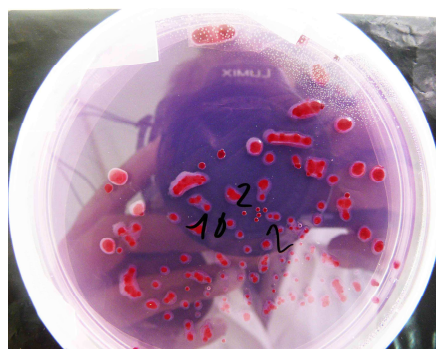


Figure 13 : Colonies de *R. solanacearum* sur milieu SMSA

La conservation de *R. solanacearum* peut se faire de trois manières différentes (Denny 2001). Premièrement, la souche peut être conservée durant plusieurs années (8 à 10 ans) en suspension dans de l'eau distillée ou désionisée sans perdre sa virulence ou changer son phénotype. Pour cultiver *R. solanacearum*, il faudra d'abord la repiquer sur du milieu TZC (Kelman, 1954) et ensuite la repiquer sur milieu CPG car certaines souches sont sensibles à un pigment produit sur le milieu TZC. La cryoconservation est le moyen le plus aisé de conserver à long termes les souches de *R. solanacearum*. Il consiste à garder les souches à basse température (-70 °C) après un protocole précis. La dernière méthode de conservation supportée par *R. solanacearum* est la lyophilisation. Dans une ampoule stérile, il faut étaler sur un milieu de suspension spécial une petite quantité de bactéries fraîches retirées d'un milieu CPG. Ensuite, l'échantillon est séché et congelé avant que l'on ne referme l'ampoule. Certaines de ces cultures sont restées viables pendant 30 ans.

La pathogénicité de *R. solanacearum* (van Elsas et al., 2001) est optimale lorsque la température de culture est supérieure à 21 °C (Graham and Lloyd, 1978). Ces conditions de température sont compatibles avec les conditions de culture des tomates variété Heatmaster utilisées dans le cadre des expérimentations réalisées en Martinique. De plus, Tans-Kersten et al. ont montré que la motilité dans l'eau est un des facteurs clés de la virulence de ce pathogène au début

de son invasion de la plante hôte (Tans-Kersten et al., 2001). *R. solanacearum* devrait donc être dans des conditions idéales pour infecter la plante.

Le milieu de culture utilisé pour la production de plants de tomates mycorhizés est le milieu SRM composé de NaFeEDTA, de nitrate de calcium, de micro et de macro-éléments (cf. Matériels et méthode). *R. solanacearum* n'a jamais été cultivé sur ce milieu et un des objectifs de ce travail est d'étudier son comportement sur milieu SRM en l'absence et en présence de plantes.

Matériels et méthodes

Comme précisées dans l'introduction, trois expériences ont été réalisées dans le cadre de ce mémoire. Les deux premières expériences (préliminaires) ont servi à établir les conditions optimales de l'étude d'interaction à proprement parler (expérience 3). Les expériences préliminaires ont eu pour objet de déterminer (1) la dynamique de colonisation de la tomate variété Heatmaster par le CMA (*Rhizophagus irregularis* MUCL 43194) et (2) la quantité d'inoculum bactérien nécessaire à une infection optimale. Ces résultats ont permis, par la suite, d'évaluer le potentiel bioprotecteur du CMA vis-à-vis de *Ralstonia solanacearum*.

I. Matériel biologique :

A. *Rhizophagus irregularis* :

La souche de CMA utilisées dans cette expérience est *Rhizophagus irregularis* ((Blaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler) MUCL 43194. Le tableau 1 reprend la fiche d'identité de la souche utilisée pour ce mémoire.

Tableau 1 : Fiche d'identité de la souche est *Rhizophagus irregularis* MUCL 43194 (adaptée de http://www.mycorrhiza.be/ginco-bel/catalogue.php?code_mucl=43194)

Numéro MUCL	43194	Habitat	Plantation d'arbres
Numéro DAOM	181602	Localité	Pont Rouge
Autre ID	DAOM 197198	Pays/région/province	Québec (Canada)
Descripteurs	(Blaszk., Wubet, Renker & Buscot) C. Walker & A. Schüßler	Collecteur au champ	C. Plenchette & V. Furlan
Synonymie	Glomus irregulare Blaszk., Wubet, Renker & Buscot	Isolateur	C. Plenchette & V. Furlan
Origine de la souche	Plantation d'arbres	Détermination/redétermination	N.C. Schenck
Hôte	<i>Fraxinum americana</i>		

Le CMA a été préalablement multiplié sur racines de carotte excisées en boîtes de Pétri bi-compartimenté à partir d'un inoculum provenant de la Mycothèque de l'UCL (MUCL43194, « starter kit », mai 2011).

B. *Solanum lycopersicum*

La variété de tomates utilisées dans les expériences est *Solanum lycopersicum* cv. Heatmaster

Les graines fournies possèdent un enrobage de fongicide dont la composition nous est inconnue.

L'enrobage de fongicide est enlevé grâce à trois rinçages successifs de 5 min dans de l'eau distillée. Pendant le premier rinçage, la plus grande partie de l'enrobage est enlevé avec une pince. Pendant le deuxième et troisième rinçage, l'enrobage résiduel collé sur les graines est délicatement grattés avec la pince.

Les graines de tomates cv. Heatmaster (± 100) débarrassées de leur enrobage sont introduites dans un tube à centrifugation contenant des billes de silice (même volume). Deux centrifugations de 30 secondes à 7000 tours/min sont réalisées avec une pause de 60 secondes au frigo pour éviter un échauffement. La centrifugation sert à créer des microfissures dans les graines pour améliorer la stérilisation. Les graines sont séparées des billes de silice et placées dans un tube Falcon®. De nombreux rinçages sont effectués lors de la stérilisation des graines. Les rinçages lents **durent 12min (L)** et les rinçages rapides **1 min (R)**. Sous la hotte à flux laminaire, les graines sont rincées à l'eau stérile ((R), (L), (R)), puis à la javel 8 % (15 min) (Phase de stérilisation). Les graines sont, de nouveau, rincées à l'eau stérile ((R), (L), (R)) et ensuite trempées dans la solution d'antibiotique (20 mg de streptomycine et 10 mg de gentamicine dans 100 ml d'eau distillée) pendant 24h (Phase de stérilisation).

Le lendemain et sous la hotte à flux laminaire, 20 ml de milieu SRM stérilisé sont coulés dans 30 boîtes de Petri mono-compartmentées. Les graines sont rincées une dernière fois à l'eau stérile ((R), (L), (R)). Dix graines de tomates cv. Heatmaster sont transférées dans chaque boîte de Petri à l'aide d'une pince stérilisée. Les boîtes sont refermées avec une bandelette de Parafilm™. Pour l'expérience I, les graines sont incubées pendant 21 jours dans une chambre de culture à 20 °C, 70-80% d'humidité relative et avec une photopériode de 16/8h. Le flux de photon est de 225 μ mol.m⁻².s⁻¹. Pour l'expérience II, les graines sont incubées pendant 20 jours dans une chambre de culture sous les conditions suivantes : photopériode 12.5/11.5h, avec température jour de 26,8-29 °C et nuit de 23-26 °C. Les conditions d'humidité et de luminosité sont inconnues.

C. *Ralstonia solanacearum*

La bactérie Gram – *Ralstonia solanacearum* utilisée fait partie d'une nouvelle souche émergente - Rsol : souche de référence du laboratoire 02.075 appartenant à la population émergente phyIII/seq4NPB

- ☐ Pour l'**expérience II**, deux solutions (10ml) d'inoculum Rsol à 10² et 10⁴ CFU/ml sont préparées le jour de l'inoculation de *R. solanacearum* (Protocole : cf. « annexe III »).

La veille de l'expérience, deux boîtes de milieu CPG (Casamino acid-Peptide-Glucose) contenant la souche Rsol (depuis 5 jours) sont grattées à l'aide d'un râteau. Ceux-ci sont ensuite frottés dans deux boîtes contenant du milieu SMSA (Seiquera Modified South Africa). Le lendemain, 5 ml d'eau stérile est ajouté dans chacune de ces boîtes et la surface est grattée avec un râteau. Les

solutions contenues (2 X 5ml) dans ces boîtes sont transférées dans un tube Falcon® et ensuite diluées 50X. Après la dilution, l'absorbance est mesurée à 600 nm avec un spectrophotomètre. Après avoir calculé la concentration de la solution mère (6×10^9 CFU/ml), on réalise 7 dilutions successives pour atteindre la concentration de 10^2 CFU/ml (la 5^{ème} dilution donne 10^4 CFU/ml). Les dilutions sont réalisées en prenant 1 ml de la solution précédente (ou solution mère pour la 1^{ère} dilution) et en rajoutant 9 ml d'eau stérile dans des tubes Falcon®.

- ❑ Pour l'expérience III, une solution (10 ml) d'inoculum à 10^4 CFU/ml est préparée le jour de l'inoculation de *R. solanacearum* (Protocole : cf. « annexe III »).

Une boîte de milieu contenant la souche Rsol (depuis 3 jours) a été utilisée comme décrite ci-dessus. Après la dilution, l'absorbance est mesurée à 600 nm avec un spectrophotomètre. Après avoir calculé la concentration de la solution mère (5×10^9 CFU/ml), on réalise 5 dilutions successives pour atteindre la concentration de 10^4 CFU/ml.

II. Techniques de culture in vitro

A. Préparation du système de culture *in vitro* HAM-P⁹(Declerck et al., 2012)

L'association entre la plante de tomate et le CMA est réalisée dans le système HAM-P (Voets et al., 2005).

Un trou (± 3 mm de diamètre) est réalisé sur le côté de chaque boîte de Petri mono compartimentée (90mm de diam.) en utilisant une pince chauffée au bec Bunsen.

Sur un plan incliné de $\pm 4^\circ$, 45ml de milieu modifié de Strullu-Romand (Declerck et al., 1998) sans sucre et sans vitamines et solidifié avec 3g/l de Gelrite™ (SRM) est coulé dans ces boîtes de Pétri. Le milieu sera donc à une hauteur de 1 à 2 mm du côté du trou et à une hauteur maximum à l'opposé de celui-ci. Cela permettra de travailler de manière plus sûre (condition stérile), car le trou fait le lien entre l'intérieur et l'extérieur de la boîte de Petri.

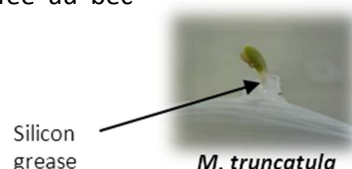


Figure 14 : Ajout de graisse de silicone sur le contour de *M. truncatula* (CESAMM/GINCO, 2012)

Des plantules de *S. lycopersicum* cv. Heatmaster de 2 semaines présentant de nombreuses racines adventives sont transférées dans les systèmes HAM-P. Le système racinaire est placé sur le milieu SRM et la tige se développe à l'extérieur à travers le trou réalisé précédemment. Cinquante spores de CMA sont ensuite transférées dans la boîte de Pétri et mises au contact des racines. Les boîtes de Petri sont fermées et scellées avec une bandelette de Parafilm™. Le trou autour de la tige de la plantule est bouché par de la graisse de silicone stérile (121°C pendant 15min) pour éviter les contaminations (Figure 14). On recouvre les boîtes de Petri avec un sac en plastique noir opaque (120 x 120 mm) (Figure 15). Les systèmes HAM-P sont alors incubés horizontalement dans une chambre de culture dans les conditions suivantes : photopériode 12.5/11.5h, intensité lumineuse inconnue,

⁹ Half-closed arbuscular mycorrhizal-plant

humidité inconnue, température nuit (19h – 6h30) : [23-26°C] et température jour (6h30 – 19h) : [26.8-29 °C].

B. Préparation du système de culture *in vitro* MDP¹⁰

L'association entre la plante de tomate et le CMA est réalisée dans le système MDP (Gallou et al., 2011; Voets et al., 2009)

Un trou (± 2 mm de diamètre) est réalisé sur les boîtes de Pétri bi-compartmentées au milieu du compartiment racinaire (CR) à égale distance de la paroi de plastique séparant le CR du compartiment hyphal (CH) (Figure 12 (b)).

Sur un plan incliné de $\pm 4^\circ$, 20 ml de milieu modifié de Strullu-Romand (Declerck et al., 1998) sans sucre et sans vitamines et solidifié avec 3g/l de Gelrite™ (SRM) est coulé dans chacun des compartiments des boîtes de Pétri bi-compartmentées. Le milieu devra atteindre la hauteur de la cloison de séparation d'un côté et sera à une hauteur de 2 à 3 mm du côté du trou.



Figure 15 : Plant de tomate en système *in vitro*

Des plantules de *Medicago truncatula* (âgées de 5 jours) présentant une bonne croissance et une racine primaire développée, sont transférées dans les systèmes MDP. Le système racinaire est placé dans le compartiment CR sur le milieu SRM et la tige se développe à l'extérieur à travers le trou réalisé précédemment. Cinquante spores de CMA sont ensuite transférées dans le CR et mises au contact des racines. Une fois la plantule transférée, les boîtes de Petri sont fermées et scellées avec une bandelette de Parafilm™. Le trou autour de la tige de la plantule est bouché par de la graisse de silicone stérile (121°C pendant 15min) pour éviter les contaminations (Figure 14). On recouvre les boîtes de Petri avec un sac en plastique noir opaque (120 x 120 mm) (Figure 15). Les systèmes MDP sont alors incubés horizontalement dans une chambre de culture à 20 °C, 70-80% d'humidité relative et avec une photopériode de 16/8h. L'intensité lumineuse est de 225 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

¹⁰ MDP :Mycelium donor plant

C. Maintenance des systèmes de culture *in vitro* HAM-P/MDP (Figure 16)

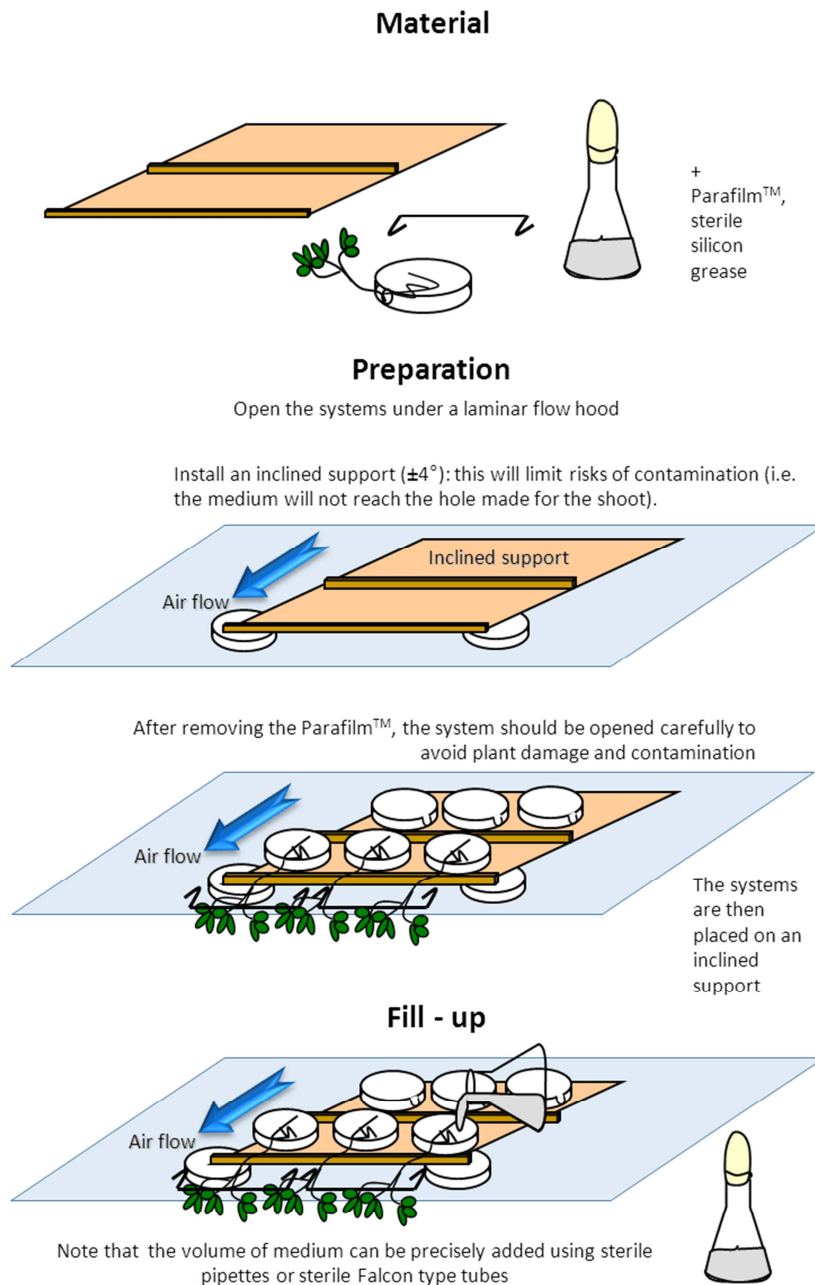


Figure 16: Schéma décrivant l'ajout de milieu au système HAM-P de culture *in vitro* (CESAMM/GINCO, 2012)

Sous hotte à flux laminaire, le Parafilm™ est retiré avant de placer les systèmes HAM-P/MDP sur le plan incliné (4°). La tige est maintenue à l'aide de perce bouchon et placée de façon à ce qu'elle soit dirigée dans le sens du flux. Le milieu SRM (30 ml dans le CC d'un système HAM-P ou 15 ml dans le CR du MDP) est alors ajouté à une température de $\pm 40^\circ\text{C}$ afin de ne pas endommager les racines ou les CMA. Une fois que le milieu SRM ajouté est solidifié, les systèmes HAM-P/MDP sont refermés et incubés comme décrit précédemment

III. Dispositifs expérimentaux

A. 1ère expérience : Colonisation de plants de tomates Heatmaster par *Rhizophagus irregularis* dans un système de culture *in vitro* MDP avec *Medicago truncatula*

1. Établissement de l'association *in vitro*

8 semaines après l'établissement des systèmes MDP, le mycélium du CMA a recouvert les compartiments CH. À ce moment, 2 plantules de tomates âgées de 21 jours ont été transférées dans chacun des systèmes MDP.

Sous la hotte à flux laminaire, les systèmes MDP sont ouverts en retirant la bandelette de Parafilm™. Dans le CH, 2 trous (± 2 mm de diamètre positionnés comme sur la figure 17) sont réalisés en utilisant une pince chauffée. Les encoches du dessus et du dessous de la boîte sont réalisées pour parfaitement correspondre. Une fois les trous réalisés, deux plantules de tomates cv. Heatmaster (âgées de 21 jours) présentant de nombreuses racines adventives sont positionnées dans chaque encoche du compartiment CH. Les racines des 2 plantules sont délicatement placées à la surface du milieu contenu dans le CH afin de les mettre en contact avec le mycélium du CMA. Les boîtes de Petri sont délicatement refermées et scellées avec une bandelette de Parafilm™. Les trous autour des tiges de *M. truncatula* et des plantules de tomate sont bouchés grâce à de la graisse de silicone stérile (121 °C pendant 15min) pour éviter les contaminations. Les systèmes MDP sont alors incubés comme décrit précédemment.

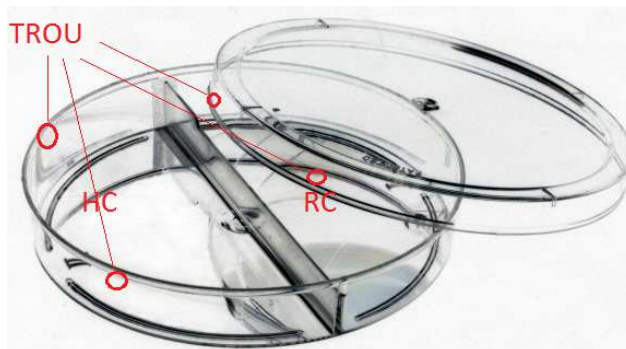


Figure 17 : Position des encoches à faire dans le compartiment CH d'une boîte de Pétri bi-compartmentée (ce schéma reflète seulement la position des encoches et non leur taille ou formes)

2. Évaluation de la colonisation racinaire

Dix jours après le transfert des plantules de tomates, seulement deux systèmes (MDP) entiers présentent des plantules de tomates vivantes. Trois plantules de tomates seront colorées afin de déterminer le pourcentage de colonisation et l'autre sera repiquée dans une boîte de Petri mono compartmentée afin d'évaluer la reprise de la mycorhization.

Les systèmes racinaires des 3 plantules destinées à la détermination de la colonisation racinaire sont retirés des systèmes MDP et placés individuellement dans des tubes Falcon®. Le milieu gélosé restant attaché aux racines est retiré grâce à 15 ml de tampon citrate (1,78mM d'acide citrique et 8,2 mM de citrate de sodium) permettant sa dissolution. Les racines sont ensuite rincées à l'eau du robinet (1 min). Les racines sont alors trempées dans du KOH à 10 % et autoclavées pendant 30 min à 90°C. Les racines sont ensuite rincées abondamment à l'eau du robinet et recouvertes du mélange encre bleu Parker™/acide acétique 5 % (en proportion 5/95) avant d'être chauffées 15 min à 80°C. Les racines sont ensuite rincées. Avant l'observation, les radicelles sont prélevées puis montées entre lames et lamelles. Les lames ont été observées à l'aide d'une binoculaire. Pour chaque répétition, 2 lames contenant 15 fragments de racines chacune sont réalisées. L'évaluation

de la fréquence et de l'intensité de mycorhization s'est réalisée selon la méthode de Trouvelot et al. (1986) avec les formules suivantes :

- Fréquence des mycorhizes dans la racine :

$$F(\%) = 100 \times \left(\frac{N - n}{N} \right)$$

avec N = nombre de fragments observés

n = nombre de fragments non mycorhizés

- Intensité de mycorhization du cortex (Figure 18) :

$$M(\%) = \frac{95 \times n_5 + 70 \times n_4 + 30 \times n_3 + 5 \times n_2 + n_1}{N}$$

avec N = nombre de fragments observés

$n_5 \rightarrow n_1$ = nombre de fragments se situant sur le niveau (5 à 1)
de l'échelle de Trouvelot (Figure 18)

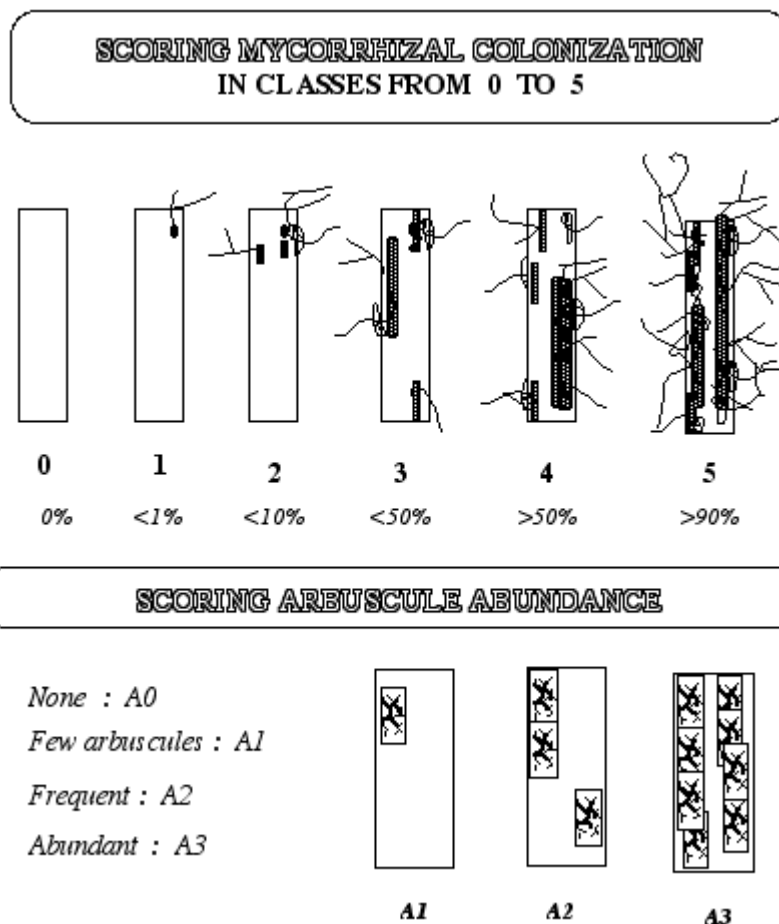


Figure 18 : Différents niveaux de l'échelle de Trouvelot et al. (1985) pour évaluer la portion du cortex racinaire colonisé par le CMA (au-dessus) et pour évaluer la présence d'arbuscule.
http://www2.dijon.inra.fr/mychintec/Protocole/Workshop_Procedures.html#trouvelot

B. 2^{ème} expérience : Détermination de la quantité d'inoculum de *Ralstonia solanacearum* (Rsol) à inoculer sur tomate cv. Heatmaster *in vitro* afin d'obtenir un flétrissement important des plants de tomates sur une période de 15 jours.

1. Méthode d'inoculation de la bactérie *R. solanacearum*

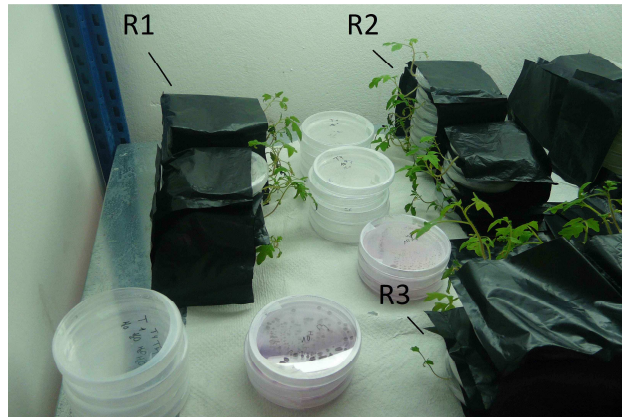


Figure 19 : Dispositif expérimental de l'expérience Rsol

Des plantules de tomates âgées de 20 jours sont placées dans des systèmes HAM-P non-inoculés par un CMA. Ces systèmes mono-compartmentés contiennent 40 ml de milieu SRM. Toutes les semaines 20 ml de milieu SRM sont ajoutés aux systèmes jusqu'à la fin de l'expérience (4 semaines)

Les systèmes sont stockés dans la chambre climatique en Martinique dans les conditions suivantes : photopériode 12.5/11.5h, intensité lumineuse inconnue, humidité inconnue, température nuit (19h – 6h30) : [23-26°C] et température jour (6h30 – 19h) : [26.8-29 °C].

L'expérience est répétée trois fois comme indiqué sur la figure 19. Ces trois répétitions sont organisées sous forme de bloc. Pour chaque répétition, chaque traitement est répété 5 fois (5 X eau stérile, 5 X 10^2 et 5 X 10^4 CFU/ml).

17 jours après le transfert des plantules de tomates, les systèmes *in vitro* sont soit inoculés avec *R. solanacearum* (200µl de 10^2 et 10^4 CFU/ml) soit reçoivent de l'eau stérile. Sous hotte à flux laminaire, le Parafilm™ est délicatement enlevé avant de retirer le couvercle des systèmes de culture *in vitro*. Les tiges sont maintenues à l'aide de pince et placées de façon à ce qu'elle soit dirigée dans le sens du flux. 200 µl de l'inoculum ou d'eau sont déposés à la surface du milieu SRM et étalés avec un râteau. Les systèmes sont délicatement refermés et incubés dans une chambre de culture comme décrit précédemment

2. Suivi du développement du flétrissement bactérien selon l'échelle de He (He, 1983) (index de flétrissement) et selon le pourcentage de plantes flétries (PWP)(Deberdt et al., 2012)

L'incidence de la maladie a été suivie selon deux échelles différentes : la première est l'échelle de He (1983) et la seconde correspond aux pourcentages de plantes flétries (Deberdt et al., 2012). Dans le reste du texte, on appellera **DI (disease index : DI)** les résultats obtenus avec l'échelle

de He (1983) et **PWP** (percentage of wilted plants) ceux obtenus avec l'échelle de Deberdt et al. (2012). Les données sont récoltées chaque jour (5, 6, 7, 8, 11, 12, 13, 14, 15) entre 8h et 10h pendant les 15 jours suivants l'inoculation de *R. solanacearum*.

☐ Échelle de He (1983)

Pour analyser le développement du flétrissement du plant de tomate, nous avons utilisé l'échelle à 5 niveaux créée par He (1983). Les 5 niveaux sont décrits ci-dessous (Figure 20)



Figure 20 : Echelle de He (1983) - A : niveau 1 - B : niveau 2 - C : niveau 3 - D : niveau 4 - E : niveau 5

✓ 5 échelons (Figure 20) :

- 1 : Pas de symptôme (A)
- 2 : 1 feuille flétrie (B)
- 3 : 2 ou 3 feuilles flétries (C)
- 4 : 4 ou plus feuilles flétries (D)
- 5 : Plante morte (E)

Analyse :

Les analyses statistiques sont réalisées avec les données suivantes qui suivent l'incidence de la maladie (DI ou PWP) et l'AUDPC (area under disease progression curve). L'AUDPC représente l'aire en dessous de la courbe : incidence de la maladie en fonction du temps. Cette valeur permet donc de regrouper les valeurs observées au cours de l'évolution d'une maladie en une seule donnée.

Pour calculer le flétrissement bactérien à partir de l'échelle de He (1983), on utilise la formule proposée par Debert et al. (1999). Dans cette formule, le niveau 1 de l'échelle de He (1983) n'est pas pris en compte pour calculer l'index de flétrissement (DI). « 1, no symptoms (class 0) » où le 1 représente le niveau de l'échelle de He (1983) transformé en « class 0 » qui n'intervient pas dans le calcul ci-dessus. Le 2^{ème} niveau de l'échelle de He (1983) correspond à la classe 1 et ainsi de suite (Deberdt et al., 1999).

$$DI = \frac{(Nbre_{de\ plantes\ classe\ 1} \times 1) + (Nbre_{de\ plantes\ classe\ 2} \times 2) + (Nbre_{de\ plantes\ classe\ 3} \times 3) + (Nbre_{de\ plantes\ classe\ 4} \times 4)}{Nbre\ totale\ des\ plantes \times 4}$$

Les valeurs des DI* mesurées quotidiennement permettent d'évaluer la sévérité de la maladie et son évolution au cours du temps représentée par la courbe AUDPC (area under the disease progress curve) = f (t_k) avec pour chaque date t_k (Campbell and Madden, 1990):

$$AUDPC(t_k) = \sum_{i=1}^{k-1} (DI_i + DI_{i+1}) \times \frac{(t_{i+1} - t_i)}{2}$$

*Les indices de flétrissement exprimé en % de plants flétris seront transformés en Arcsin (DI) afin de linéariser les données (rapproche les données fort écartées) et les AUDPC seront parfois transformées en racine(AUDPC) pour que le modèle corresponde mieux (Seassau et al., 2010; Voets et al., 2009).

□ Pourcentage de plantes flétries (PWP):

Cette échelle prend en compte le pourcentage de plantes flétries uniquement quand celles-ci présentent déjà un important flétrissement considéré comme irréversible. Il n'y a donc que deux niveaux :

→ 1 = plante flétrie, entièrement flétrie ou aux trois quarts flétrie (ce qui correspond aux stades 4 et 5 de l'échelle de He (1983)).

→ 0 = pas de symptôme (correspond aux niveaux 1, 2, 3 de l'échelle de He (1983)).

Analyse :

Le pourcentage de plantes flétries à la date t_k nous permet d'évaluer l'incidence de la maladie à cette même date et son évolution au cours du temps représenté par la courbe PWP= f (t_k) avec pour chaque date (t_k)(Campbell and Madden, 1990) :

$$PWP(t_k) = \frac{\text{Nb de plantes flétries à la date } t_k}{\text{Nb de plantes totales}}$$

Les valeurs des indices de flétrissement* bactérien mesurées quotidiennement permettent d'évaluer la sévérité de la maladie et son évolution au cours du temps représenté par la courbe AUDPC (area under the disease progress curve) = f (t_k) avec pour chaque date t_k :

$$AUDPC(t_k) = \sum_{i=1}^{k-1} (PWP_i + PWP_{i+1}) \times \frac{(t_{i+1} - t_i)}{2}$$

*: Les valeurs du pourcentage de plantes flétries sont transformés en Arcsin (PWP) afin de linéariser les données (rapproche les données fort écartées) et les AUDPC sont parfois transformées en racine(AUDPC) pour que le modèle corresponde mieux (Seassau et al., 2010; Voets et al., 2009).

C. 3^{ème} expérience : Évaluation in vitro du potentiel bioprotecteur des champignons mycorrhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate

L'expérience préliminaire I a pu montrer qu'une mycorrhization des plantules de tomates cv. Heatmaster était possible après contact (10 jours) avec le mycélium extraracinaire d'un système MDP

(cf. Expérience I). En réalisant l'expérience II, nous avons aussi observé que les plantules de tomates pouvaient vivre plus de 50 jours en condition *in vitro*.

L'évaluation du potentiel bioprotecteur des CMA sera donc réalisée en systèmes de culture *in vitro* HAM-P en boîtes de Petri mono-compartmentées (Figure 21).

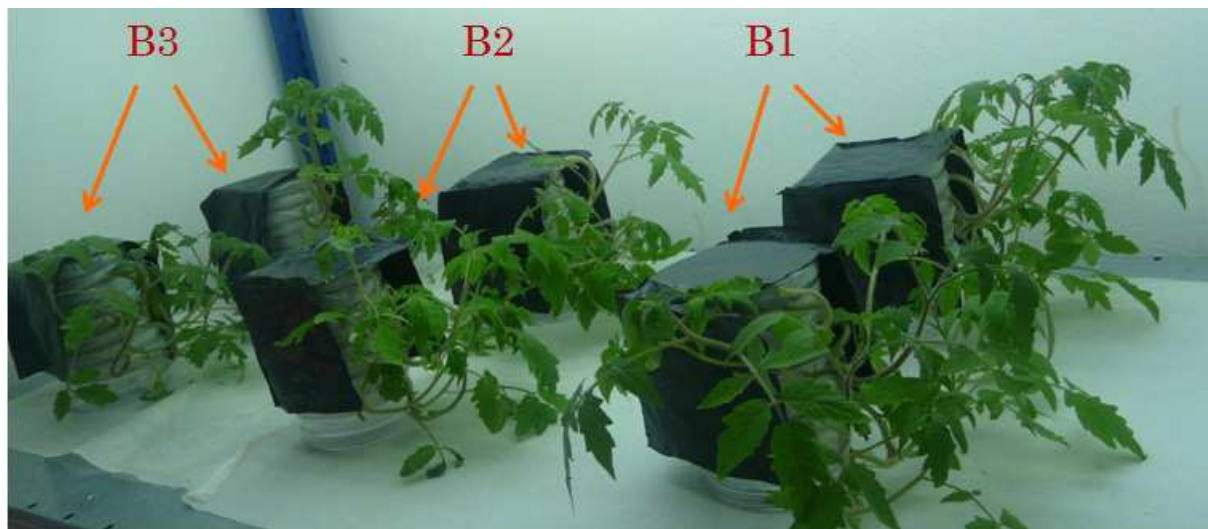


Figure 21 : Disposition des systèmes de culture *in vitro* pour l'expérience III

L'expérience est répétée **trois fois** comme indiqué sur la figure 21. Ces trois répétitions sont organisées sous forme de bloc. Pour **chaque bloc**, il y a **4 traitements** différents (**MYC+/R+**, **MYC+/R-**, **MYC-/R+** et **MYC-/R-**). Pour finir, **chaque traitement** est appliqué sur **4 plantes** différentes.

⇒ 3 (répétitions) X 4 (traitements) X 4 (plantes) = 48 plantes au total

48 plantules âgées de 13 jours sont transférées dans 24 systèmes HAM-P (**MYC+**) et 24 systèmes « HAM-P » ne contenant pas de CMA (**MYC-**). Les systèmes mono-compartmentés sont remplis avec 40 ml de milieu SRM en début d'expérience. Au cours de l'expérience, 20 ml de milieu SRM sont rajoutés toutes les semaines (les 3 premières semaines), ensuite tous les 3 à 4 jours (semaine 3 à 7) et pour finir tous les 2 à 3 jours (semaine 7 à 9).

Les systèmes sont stockés dans la chambre climatique en Martinique dans les conditions suivantes : photopériode 12.5/11.5h, flux de photon inconnu, humidité inconnue, température nuit (19h – 6h30) : [23-26°C] et température jour (6h30 – 19h) : [26.8-29 °C].

43 jours après le transfert des plantules de tomates, les plants avec et sans CMA sont inoculés pour moitié avec *R. solanacearum* (200µl à 10^4 CFU/ml) (**R+**). L'autre moitié reçoit 200 µl d'eau stérile (**R-**). Sous hotte à flux laminaire, le Parafilm™ est délicatement enlevé avant de retirer le couvercle des systèmes de culture *in vitro*. Les tiges sont maintenues à l'aide de pince et placées de façon à ce qu'elle soit dirigée dans le sens du flux. 200 µl de l'inoculum ou d'eau sont déposés à la surface du milieu SRM et étalés avec un râtelier. Les systèmes sont délicatement refermés et incubés dans une chambre de culture comme décrit précédemment

20 jours après l'inoculation, les systèmes racinaires des plantules MYC+ sont retirés des systèmes HAM-P et placés individuellement dans des tubes Falcon®. Les racines sont colorées et observées pour le taux de mycorhization suivant le protocole décrit ci-dessus (cf. Expérience I).

1. Suivi du développement du flétrissement bactérien grâce à l'échelle de He (1983) (Disease index) et du nombre de plantes flétries (PWP)

Après l'inoculation de Rsol à 10^4 CFU/ml, les données sont récoltées tous les matins entre 9h et 11h pendant 20 jours (4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 18, 19, 20^{ème} jour)

Le suivi du développement du flétrissement bactérien et les analyses statistiques sont réalisées de la même manière que pour l'expérience II.

2. Analyse enzymatique

L'activité enzymatique de la lipoxygénase et la peroxydase a été mesurée sur les feuilles des plantes par un autre laboratoire du PRAM. Les feuilles ont été coupées 20 jours après l'inoculation de la bactérie. 4 plantes de la modalité M-/R+, 3 plantes de la modalité M+/R+, 2 plantes de la modalité M-/R- et 5 plantes de la modalité M+/R- ont été utilisées pour mesurer l'activité enzymatique.

IV. Analyse Statistique

Les tableaux de données, l'arcsin (PWP), l'arcsin (DI) et les AUDPC ont été réalisés avec le tableur Excell 2007 sur base des formules suivantes :

$$PWP(t_k) = \frac{\text{Nb de plantes flétries à la date } t_k}{\text{Nb de plantes totales}}$$

$$DI = \frac{[(\text{Number of plants in class 1} \times 1) + (\text{Number of plants in class 2} \times 2) + (\text{Number of plants in class 3} \times 3) + (\text{Number of plants in class 4} \times 4)]}{(\text{Total number of plants in the treatment} \times 4)}$$

$$AUDPC(t_k) = \sum_{i=1}^{k-1} (y_i + y_{i+1}) \times \frac{(t_{i+1} - t_i)}{2}$$

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel JMP (SAS institute inc., Cary, USA). La signification des différents effets influençant le flétrissement bactérien et les AUDPC ont été analysés grâce à des ANOVA II modèles mixtes avec effet aléatoire sur le bloc et des tests de Student et Tukey ($p < 0.05$). L'option création de graphique de JMP a été utilisée pour réaliser les différents graphiques.

Les graphiques relatifs à l'activité enzymatique ont été réalisés avec Excell. L'expression enzymatique de la lipoxygénase et de la peroxydase a été évaluée grâce à une ANOVA I (JMP). Le test de Tukey ($\alpha < 0.05$) et de Student ($\alpha < 0.05$) ont permis d'analyser les différences significatives entre traitements.

La parité de certaines données a aussi été évaluée avec le logiciel JMP. Un test de Student ($\alpha < 0.05$) a été réalisé pour montrer s'il existait une différence significative entre ces données paires.

Résultats

I. 1ère expérience : Colonisation de plants de tomates Heatmaster par *Rhizophagus irregularis* dans un système de culture *in vitro* MDP avec *Medicago truncatula*

Suite à de nombreux problèmes, aucune analyse n'a pu être réalisée :

- Le mycélium du CMA ne s'est pas développé de manière optimale dans le CH de la boîte de Pétri bi-compartmentée
 - o Seuls 8 systèmes ont été obtenus (au lieu de 20) → 16 plants de tomates transplantés. Ceci a empêché de réaliser une expérience de dynamique de colonisation.
- Faible taux de survie des plants de tomates lors du transfert dans le compartiment CH du système de culture HAM-P.
 - o Seulement 4 plants de tomates ont survécu

Analyse :

Après 10 jours, les 4 plants de tomates ont été arrachés

- 3 plantes ont été colorées
 - o 1 présente une mycorhization normale (arbuscules et vésicules observables).
 - o Les 2 autres présentent très peu d'hyphes (majoritairement extraracinaires attachés aux racines).

Au vu de ces résultats, nous n'avons pu établir de dynamique de colonisation. Cependant la colonisation racinaire a été observée après 10 jours dans les plantes qui ont survécu. La colonisation racinaire a, par ailleurs, été confirmée par d'autres expériences menées au laboratoire (communication personnelle).

II. 2^{ème} expérience : Détermination de la quantité d'inoculum de *Ralstonia solanacearum* (Rsol) à inoculer sur tomate cv. Heatmaster *in vitro* afin d'obtenir un flétrissement important des plants de tomates sur une période de 15 jours

La bactérie est visible sur le milieu SRM à partir du 5^{ème} jour après inoculation. Les boîtes inoculées avec 10^2 et 10^4 CFU/ml présentaient de nombreuses colonies (plus de 100) à la surface du milieu SRM. 5 de ces boîtes présentent un développement plus important de bactérie en surface du milieu au-dessus des racines de la plante, mais aucun signe réel de flétrissement n'est

visible.

Les premiers symptômes apparaissent au 7^{ème} jour après inoculation. Trois plantes présentaient un flétrissement bactérien **avancé** (plus de 4 sur l'échelle de He (1983)). C'est aussi à cette date que les colonies commencent à se développer autour des racines (10% des plantes inoculées) (Figure 22).

Après 11 jours, 6 plantes (20% des plantes inoculées) présentent de jeunes racines entourées de la bactérie *R. solanacearum*. En tout, 12 plantes (40% des plantes inoculées) présentent un flétrissement avancé (dont les 6 plantes développant la bactérie autour de leur racine). Après 15 jours d'observation, 53,33% des plantes inoculées étaient flétries et aucune plante témoin ne présente de symptômes avancés de flétrissement.

Après la transformation (cf. Matériels et méthodes) des données recueillies le 15^{ème} jour (**uniquement**), le pourcentage de flétrissement des plantes est supérieur à 60% pour le traitement à 10^2 CFU/ml (DI : 68 ± 9 % et PWP : 60 ± 11 %) le dernier jour de l'expérience. Le traitement 10^4 CFU/ml présente un pourcentage de flétrissement plus faible (DI : 58 ± 7 % et PWP : 47 ± 7 %). Pour finir, aucune plante morte n'a été observée sur les témoins eau stérile (DI : 14 ± 4 % et PWP : 0 ± 0 %).



Figure 21 : jeune racine de tomates cv. Heatmaster entourée de la bactérie *R. solanacearum* en condition *in vitro*

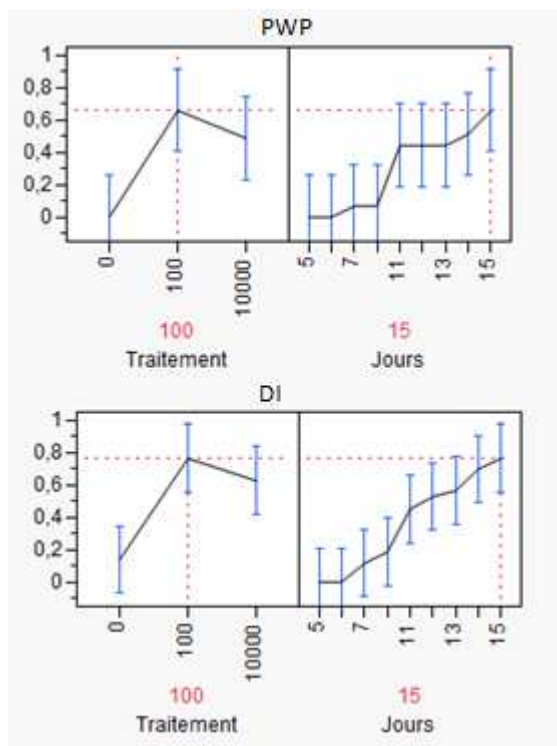


Figure 22 : Profil des valeurs et de leurs prévisions au cours du temps. Les deux graphiques côte à côte sont liés entre eux (pointillés rouges). À droite : Profil du traitement 100 CFU/ml au cours du temps. À gauche : graphique des valeurs pour les différents traitements au 15^{ème} jour. En bas, selon le DI. En haut selon le PWP.

En tenant compte de l'entièreté des données sur les 15 jours, en séparant le DI et le PWP, les traitements 10^2 et 10^4 CFU/ml sont significativement différents du témoin eau stérile selon le test de Fisher ($\alpha < 0,05$) et non significativement différents entre eux. Les deux concentrations permettent de suivre correctement l'incidence de la maladie. Le modèle utilisé pour cette analyse est validé grâce à un bon graphe des résidus (meilleur dans le cas du DI) et un R^2 suffisant (DI : 81 % et PWP : 86 %). Dans cette analyse, une grande partie de la variance est expliquée par le bloc (43,4 % pour le PWP et 35,8 % pour le DI). Le profil des prévisions est visible à la figure 23 pour les 2 différentes échelles. L'évolution de l'index de flétrissement selon les différents blocs et les différents traitements est reprise quant à elle dans la figure 24.

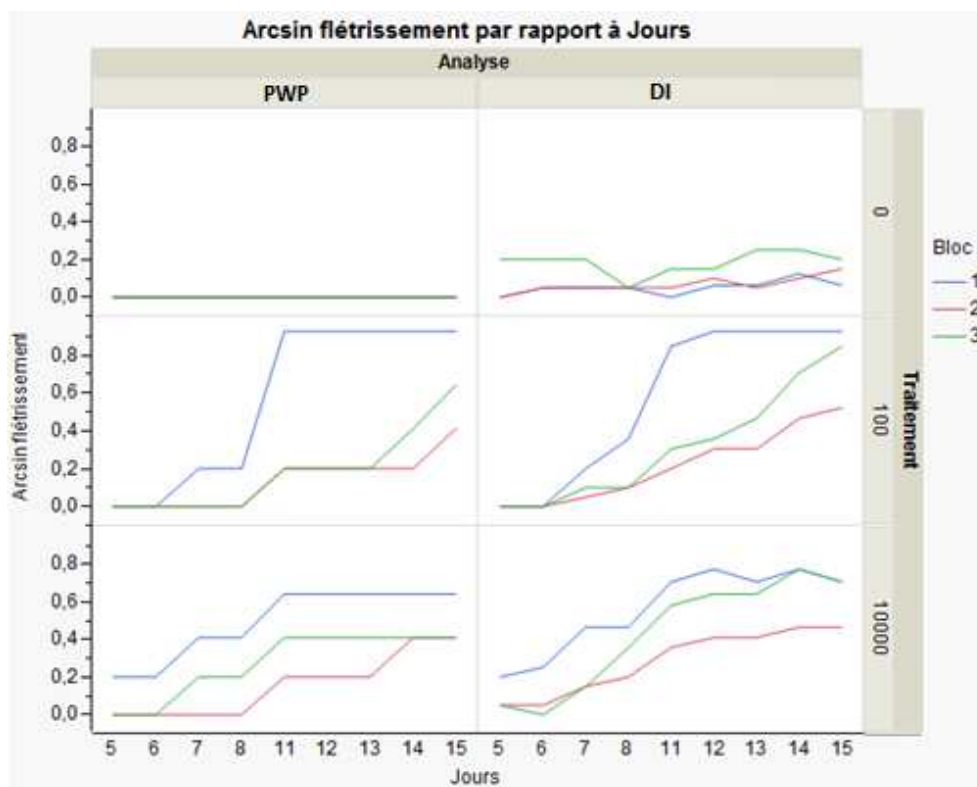


Figure 23 : Graphique de l'Arcsin « flétrissement » en fonction des jours, des blocs, des traitements et de l'analyse (DI ou PWP). Le traitement s'exprime en 0,100 et 10000 CFU/ml.

En ce qui concerne l'AUDPC (qui transforme toutes les valeurs observées au cours du temps en une seule valeur), le traitement 10^4 CFU/ml est significativement différents du témoin eau stérile selon le test de Tukey ($\alpha < 0,05$), mais non significativement différent du traitement 10^2 CFU/ml. Le traitement 10^2 CFU/ml est significativement différent du témoin seulement avec l'échelle PWP (Tableau 2). Avec un test de Student ($\alpha < 0,05$), le traitement 10^2 CFU/ml est significativement différent du témoin avec les deux échelles.

Tableau 2 : Valeurs des racines (AUDPC) suivant les différentes modalités et les deux analyses (PWP et DI). Les lettres sont le résultat du test de Tukey ($p < 0.05$). Si les lettres sont identiques, c'est que les valeurs ne sont pas significativement différentes.

Traitement	Racine (AUDPC)	
	Index de flétrissement (DI)	Pourcentage de plantes flétries (PWP)
10^2 CFU/ml	$1,84 \pm 0,30$ AB	$1,58 \pm 0,41$ A
10^4 CFU/ml	$2,07 \pm 0,21$ A	$1,71 \pm 0,31$ A
Eau stérile	$0,92 \pm 0,18$ B	0 ± 0 B

Le modèle qui nous a permis d'analyser les racines (AUDPC) est validé par un R^2 suffisant (PWP : 90,5 % et DI : 79 %) et un bon graphe des résidus. En utilisant le test de Tukey ($\alpha \pm 0,05$) sur les données racines (AUDPC), l'effet bloc (aléatoire) est non significatif pour les deux échelles. Par contre, une grande partie de la variance est expliquée par le bloc (44,4 % pour le PWP et 20,8 % pour le DI).

Les graphiques des prévisions des profils pour les deux différentes échelles sont semblables (Figure 25). En mesurant la parité des mesures (racine (AUDPC)) selon les deux différentes échelles, un test de Student ($\alpha \pm 0,05$) montre que les valeurs AUDPC de l'échelle de PWP sont significativement inférieures aux valeurs de l'échelle de He (1983).

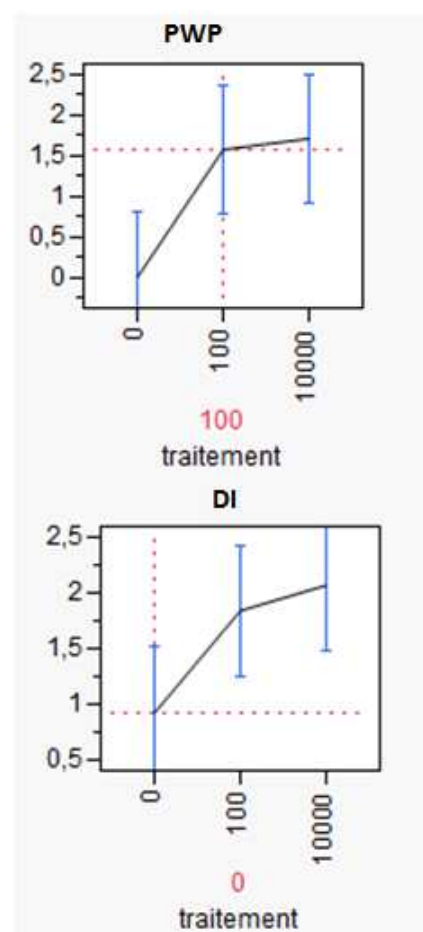


Figure 24 : Profil des prévisions et des valeurs d'Arcsin (AUDPC) pour les différents traitements et selon l'analyse (PWP en haut et DI en bas)

III. 3^{ème} expérience : Évaluation in vitro du potentiel bioprotecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate

Après 9 jours, la bactérie *R.solanacearum* s'est développée autour des jeunes racines de l'entière des plantes inoculées. L'évolution de la colonisation bactérienne est similaire pour les plantules MYC+ et les plantules MYC-.

Le taux de colonisation racinaire par le CMA est faible. Sur les 24 plantes inoculées, seules 10 ont présenté une très faible présence (moins de 10 % en fréquence et en intensité (Trouvelot et al., 1986)) de colonisation racinaire. Ceci correspond à la présence de quelques hyphes, mais aucune vésicule ni arbuscule n'ont été observées à l'intérieur de ces racines.

Dans un premier temps, les données sont traitées en tenant uniquement compte des plantes présentant un taux de mycorhizes (pour les modalités MYC+). Les résultats ne montrent pas de différences significatives sur l'incidence de la maladie entre les plantes MYC+ et MYC- quand un test de Student ($\alpha \pm 0,05$) est réalisé sur des données paires (MYC+/R+ avec MYC-/R+ et MYC+/R- et MYC-/R-) au cours du temps.

Les analyses suivantes ont été réalisées en considérant quatre traitements (MYC+/R+, MYC-/R+, MYC+/R- et MYC-/R-). L'effet traitement est significatif selon Tukey ($\alpha \pm 0,05$) et les traitements sont similaires deux à deux (MYC+/R+ similaire à MYC-/R+ et MYC+/R- similaire à MYC-/R-) (Tableau 3) pour les deux échelles (DI et PWP). Les modèles utilisés ont un R^2 important (PWP : 91 % et DI : 92 %) et un bon graphe des résidus. L'analyse de l'évolution du flétrissement bactérien au cours du temps montre que l'effet modalité, l'effet jours et l'effet modalité*jours sont significatifs selon le test de Fisher ($\alpha < 0,05$) pour les deux échelles.

Tableau 3 : Moyennes des moindres carrés des différentes modalités calculés avec le test de Tukey ($\alpha < 0,05$) en fonction des analyses (PWP et DI). Les lettres sont le résultat du test de Tukey ($\alpha < 0,05$). Si les lettres sont identiques, les valeurs ne sont pas significativement différentes.

	Moyennes des moindres carrés	
	DI	PWP
MYC-/R+	0,791 A	0,757 A
MYC+/R+	0,875 A	0,762 A
MYC+/R-	0,191 B	-1,11E-16 B
MYC-/R-	0,232 B	-1,665E-16 B

Selon le test de Tukey ($\alpha \pm 0,05$), l'effet bloc n'est pas significatif. De plus, le pourcentage de la variance du aux blocs est très faible (2,9 % pour le DI) voir nul (pour le PWP). Les profils des prévisions sont semblables entre les différentes échelles, mais aussi entre les modalités R+ et les modalités R- (Figure 27). L'évolution du DI et du PWP selon les différents blocs et les différents traitements est reprise dans la figure 26.

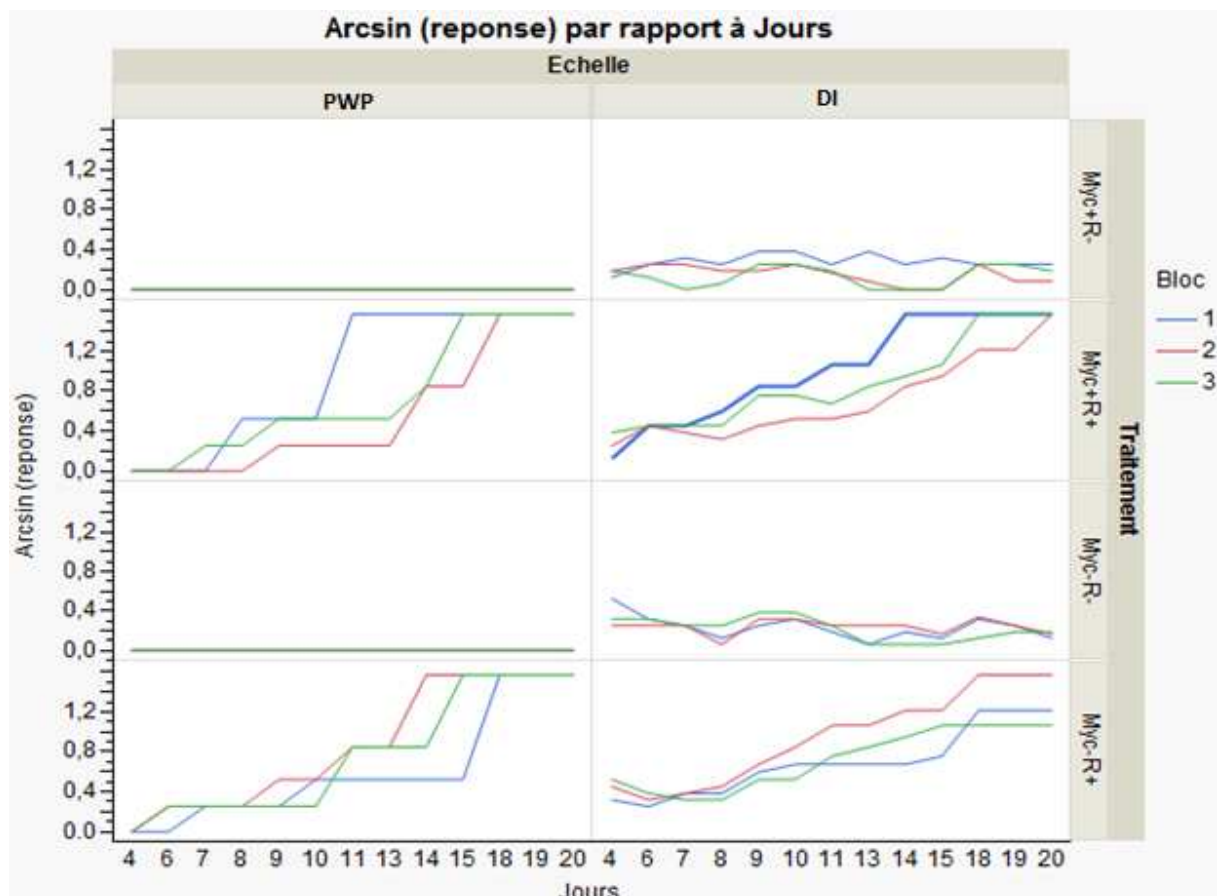


Figure 25 : Graphique de l'évolution de l'Arcsin du « flétrissement » en fonction des jours, des blocs, des modalités et de l'analyse (PWP ou DI).

Pour les deux analyses, l'effet modalité est significatif selon un test de Fisher ($p < 0,05$). Un test de Tukey ($\alpha < 0,05$) sur les différentes modalités montre que les valeurs des AUDPC sont groupées deux à deux (MYC+/R+, MYC-/R+, MYC+/R- et MYC-/R-)(Tableau 4). Le modèle statistique créé pour les AUDPC est validé grâce à un bon graphe des résidus (meilleur dans le cas du DI) et un R^2 suffisant (PWP : 80 % et DI : 93 %). Dans ce modèle, le bloc n'intervient pas dans la variance et les blocs ne sont pas significativement différents entre eux selon le test de Tukey ($\alpha < 0,05$).

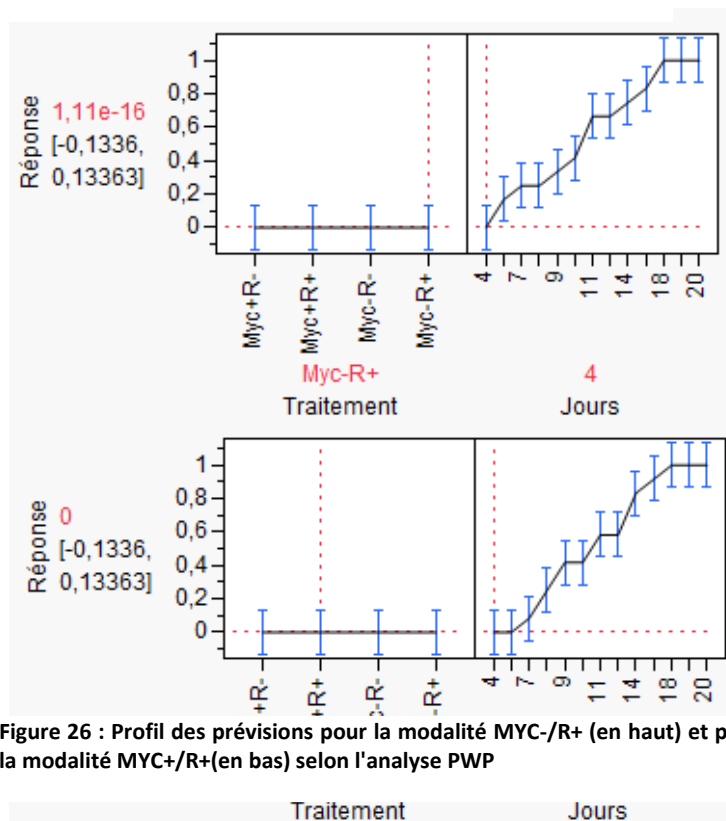


Figure 26 : Profil des prévisions pour la modalité MYC-/R+ (en haut) et pour la modalité MYC+/R+ (en bas) selon l'analyse PWP

Tableau 4: Valeurs des racines (AUDPC) suivant les différentes modalités et les deux analyses (PWP et DI). Les lettres sont le résultat du test de Tukey ($p < 0.05$). Si les lettres sont identiques, c'est que les valeurs ne sont pas significativement différentes.

Traitement	AUDPC	
	Index de flétrissement (DI)	Pourcentage de plantes flétries (PWP)
MYC-/R+	$5,85 \pm 0,35$ A	$5,21 \pm 0,43$ A
MYC+/R+	$6,10 \pm 0,38$ A	$5,04 \pm 0,58$ A
MYC+/R-	$1,59 \pm 0,39$ B	0 ± 0 B
MYC-/R-	$1,89 \pm 0,10$ B	0 ± 0 B

Enfin, on peut remarquer que l'évolution de l'incidence de la maladie (Arcsin) suit une courbe linéaire (Figure 28). Des tests d'équivalence ($\alpha = 0,05$) sur les lignes ont montré que les modalités MYC+/R+, MYC-/R+ et MYC+/R- et MYC-/R- étaient égales entre elles.

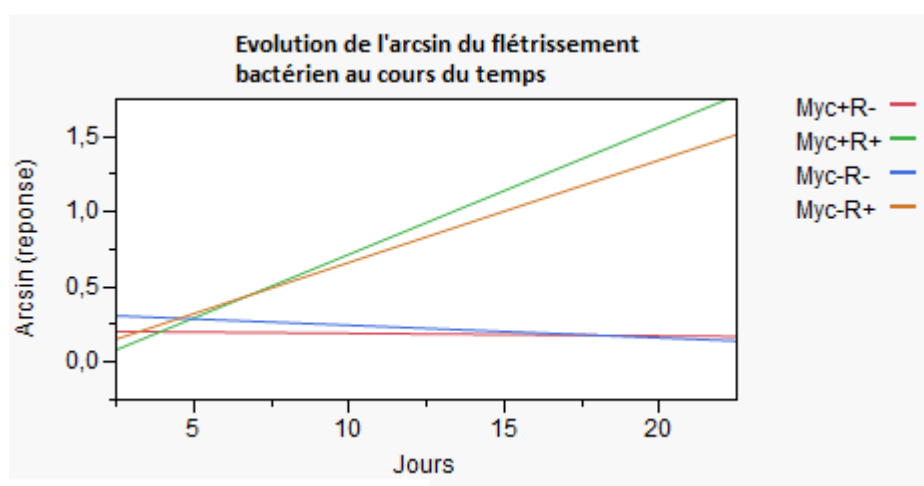


Figure 27 : Évolution de l'Arcsin du flétrissement bactérien au cours du temps

Les résultats des analyses enzymatiques pour la peroxydase et la lipoxigénase sont repris dans les figures 29 et 30. Les données recueillies pour l'analyse enzymatique ne se basent pas sur toutes les plantes, car certaines (les plus flétries) ne donnaient pas assez de matière sèche pour l'analyse.

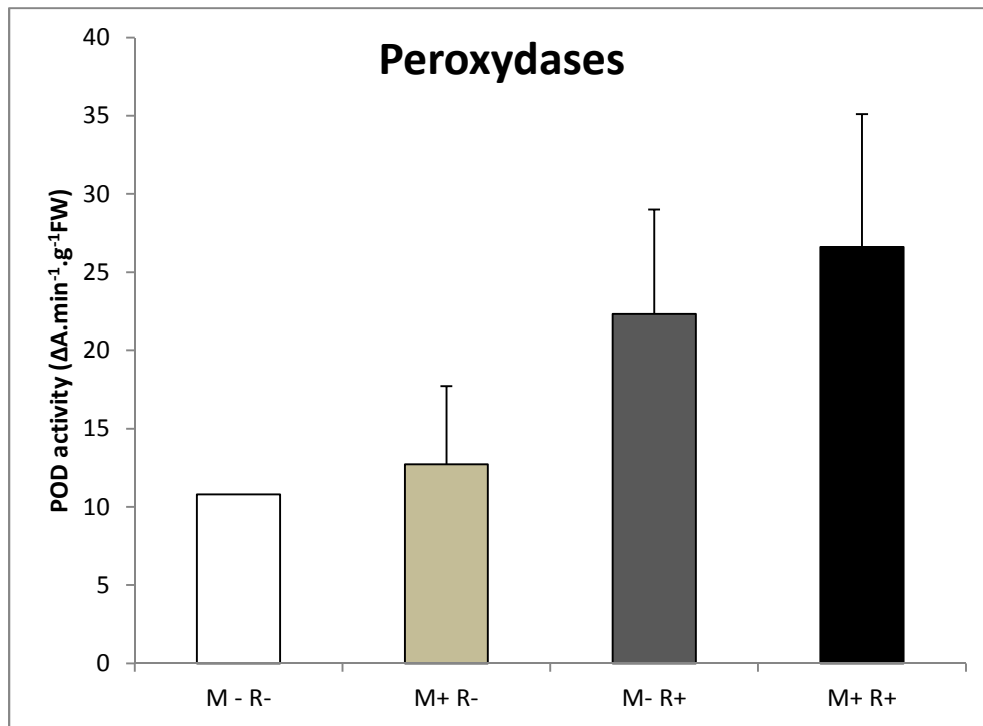


Figure 28 : Graphique de l'activité enzymatique ($\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière sèche) de la peroxydase selon les 4 différentes modalités.

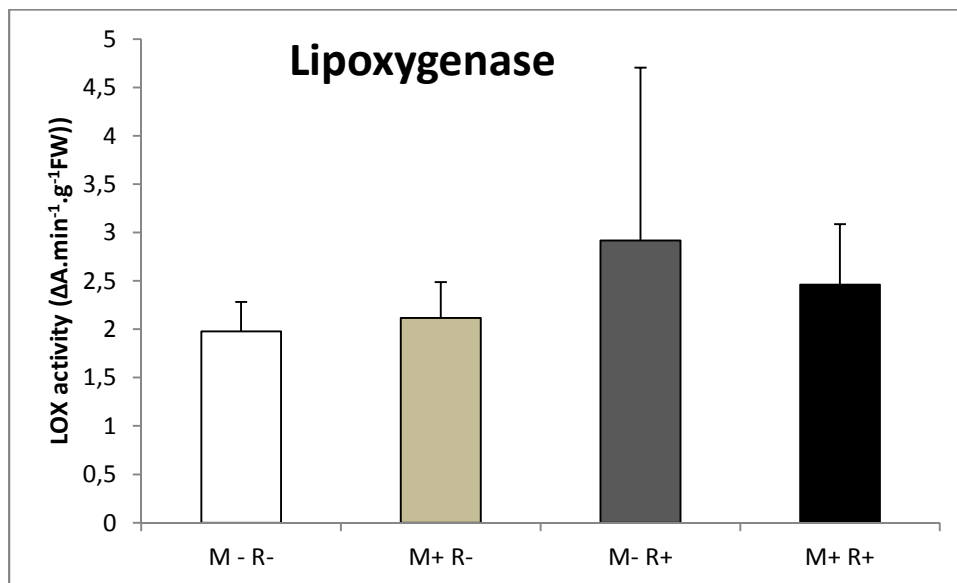


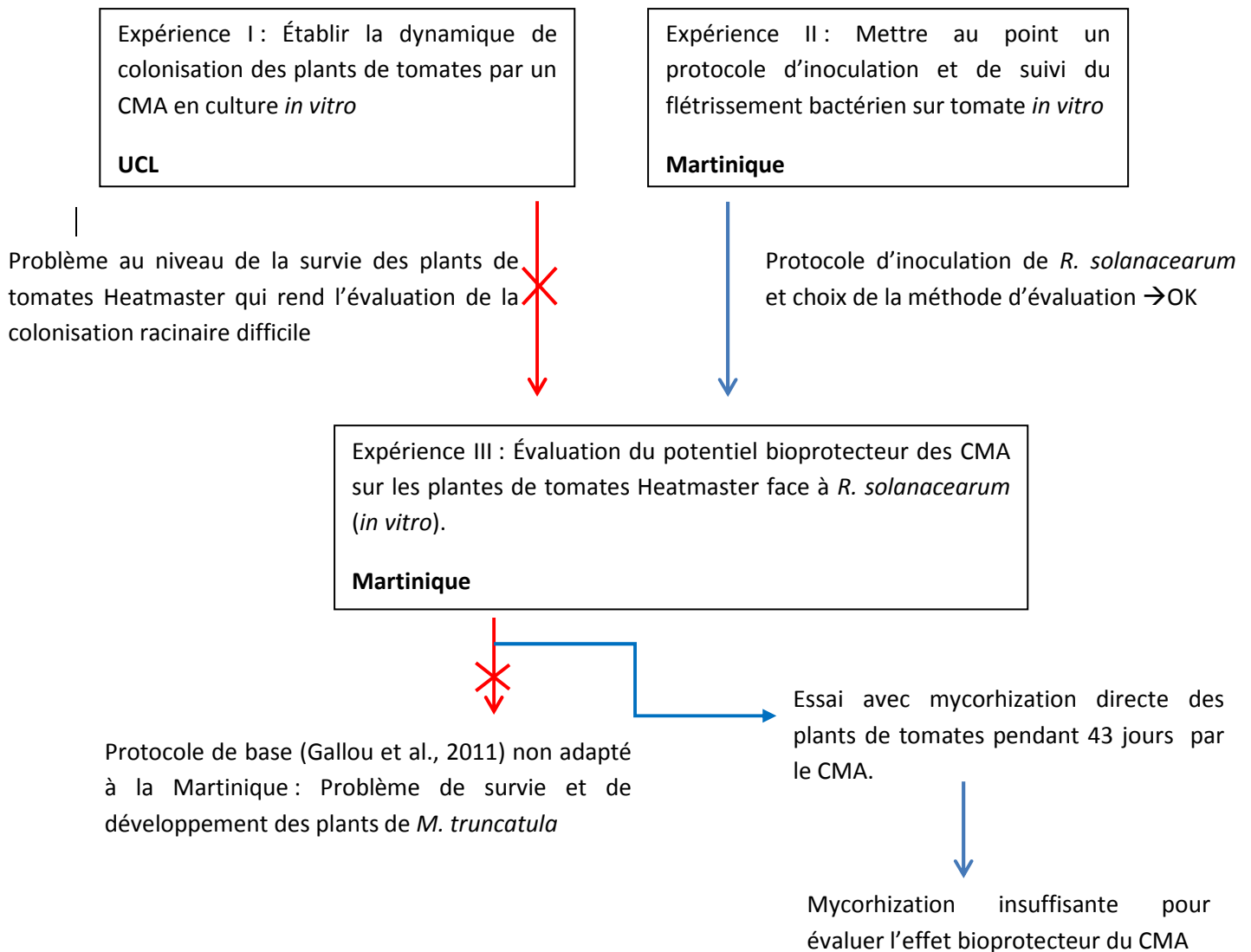
Figure 30 : Graphique de l'activité enzymatique ($\text{Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière sèche) de la lipoxygénase selon les 4 différentes modalités.

L'activité enzymatique de la lipoxygénase est similaire pour les 4 modalités différentes. En réalisant une ANOVA I avec les données relatives à l'activité enzymatique de la lipoxygénase, aucun modèle valide n'a été trouvé ($R^2 < 10\%$). Les données ont donc été appariées (MYC+/R+ avec MYC-R+, MYC+/R- avec MYC+R+, MYC+/R- avec MYC-R- et MYC+/R+ avec MYC-R-). La seule paire significativement différente selon un test de Student ($\alpha < 0,05$) est MYC+/R+ avec MYC-R-. Par contre, cette paire ne possède qu'un seul degré de liberté et n'est donc pas très fiable. En ne considérant que la modalité R+ ou R- pour la lipoxygénase, un test de Student ($\alpha < 0,05$) ne montre pas de différences significatives lorsqu'on paire les données.

L'activité enzymatique de la peroxydase est significativement différente pour les modalités R+ et R-. Le modèle utilisé explique à peine la moitié des valeurs ($R^2 = 59\%$). Ce modèle peu fiable montre qu'il existe un effet traitement significatif selon le test de Fisher ($p < 0,05$). L'appariement des données est réalisé en ne considérant que deux modalités (R+ ou R-). Cette mesure de la parité montre avec un test de Student ($\alpha < 0,05$) qu'il existe une différence significative importante entre les plantes R+ et R- pour l'activité en peroxydase. L'activité moyenne est plus importante pour les plantes R+ ($25,34 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière sèche - erreur standard : 2,71) que R- ($12,04 \text{ Abs} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ de matière sèche - erreur standard : 1,85).

Discussion

I. Récapitulatif



II. 1ère expérience : Colonisation de plants de tomates Heatmaster par *Rhizophagus irregularis* dans un système de culture *in vitro* MDP avec *Medicago truncatula*

La première expérience avait pour objectif de réaliser une dynamique de colonisation des plants de tomate en fonction du temps de séjour dans le compartiment hyphal d'un système *in vitro* MDP (cf. État de l'art). Cette courbe n'a pas pu être réalisée puisqu'un nombre insuffisant de données ont été récoltées.

Même si très peu de résultats ont été obtenus, on a pu observer la colonisation racinaire avec présence d'arbuscules et de vésicules. Cette observation est corroborée par d'autres expériences menées au laboratoire (communication personnelle) et démontre clairement que la mycorhization des plantules de tomates en conditions *in vitro* est possible, mais requiert certaines adaptations pour augmenter la survie des plantules.

En effet, l'expérience n'a pu être réalisée correctement en raison du faible taux de survie des plants de tomates. Seulement, 4 plants de tomates (sur 16) ont survécu au transfert dans les compartiments CH (compartiment hyphal) des boîtes MDP. Des précautions avaient pourtant été prises, car nous avons testé la survie des plantules de tomates en chambre climatique sur 5 plantules âgées de 10 jours. Un flétrissement (pendant 2 jours) a été observé au retour de la hotte à flux laminaire, mais par la suite les plantules se sont développées sans soucis pendant 3 semaines. L'âge des plantules de tomates transféré (21 jours), le temps de séjour sous la hotte à flux laminaire plus important et les conditions environnementales non optimales (température trop basse et dessèchement sous la hotte) pourraient être responsables du faible taux de survie des plantules de tomates. En effet, la tomate Heatmaster est une variété spécialement utilisée dans les climats tropicaux (chauds et humides). Certaines petites contaminations présentes dans les systèmes pourraient aussi être à l'origine de ce faible taux de survie, car les 4 plantules qui ont survécu étaient toutes dans les mêmes systèmes.

Une des solutions possibles est d'utiliser des systèmes *in vitro* entièrement fermés (Arbuscular Mycorrhizal-Plant (AM-P)) (Dupré de Boulois et al., 2006). Ces systèmes (Figure 31) empêcheraient le dessèchement des plantules de tomates et en particulier lors de leur transfert sous la hotte à flux laminaire.

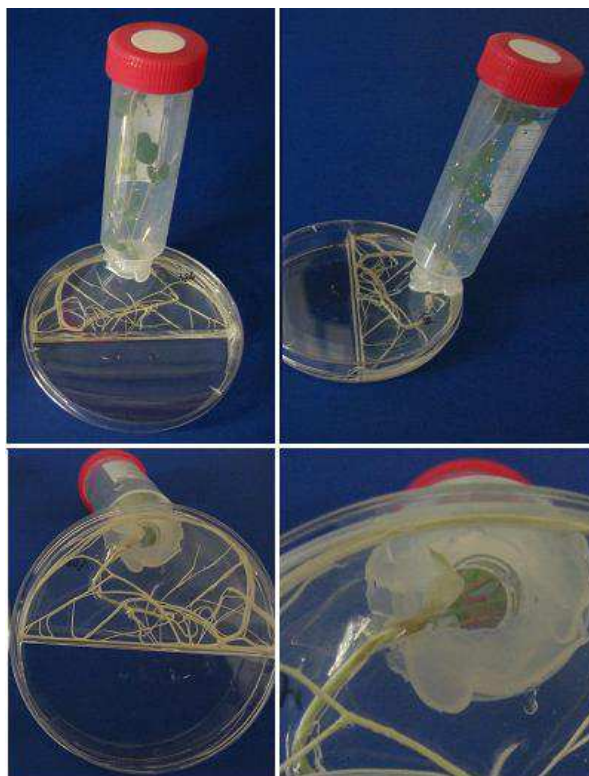


Figure 29 : Système de culture *in vitro* AM-P (Arbuscular Mycorrhizal-Plant) développé par Dupré de Boulois et al. (2006)
http://www.mycorrhiza.be/formation/in_vitro_culture_AMF/amp.php

III. 2^{ème} expérience : Détermination de la quantité d'inoculum de *Ralstonia solanacearum* (Rsol) à inoculer sur tomate cv. Heatmaster *in vitro* afin d'obtenir un flétrissement important des plants de tomates sur une période de 15 jours

L'expérimentation a permis de valider le protocole d'inoculation de *R. solanacearum in vitro*. L'établissement du flétrissement bactérien s'étale sur la période souhaitée (± 15 jours) et semble évoluer de manière linéaire.

La détermination de la quantité d'inoculum de Rsol permettant l'observation du flétrissement bactérien sur tomates cultivées en système *in vitro* a été déterminée pour la première fois. Les précédentes études (Deberdt et al., 1999; Zhu and Yao, 2004) n'évaluaient pas la quantité de Rsol à inoculer *in vitro* et donc les concentrations étaient beaucoup plus élevées (10^8 CFU/ml). Pour connaître l'ordre de grandeur de l'inoculation, une expérience préliminaire a été menée en inoculant 200 μ l de Rsol à 10^5 CFU/ml sur des plantules de tomates *in vitro* âgées de 14 jours (résultats non repris). L'évaluation a montré que la plupart des plantes étaient flétries en moins d'une semaine. Le choix des concentrations 10^2 CFU/ml et 10^4 CFU/ml était basé sur cette expérience préliminaire en visant un étalement du flétrissement bactérien sur une durée de 15 jours.

Notre expérience a montré que le développement de Rsol sur le milieu SRM est possible. D'ailleurs, les premières observations après l'inoculation de Rsol (10^2 CFU/ml et 10^4 CFU/ml) visaient à observer le comportement de *R. solanacearum* qui possède un à quatre flagelles polaires lui permettant de se mouvoir (Bergey et al., 1975) dans ce milieu. Tans-Kerstén et al. supposent que la motilité dans l'eau joue un rôle important dans les premiers stades de l'infection de la plante par *R. solanacearum* (Tans-Kerstén et al., 2001). Dans notre expérience, le développement des bactéries était visible autour des jeunes racines de plantes flétries (ou flétries 1 à 2 jours après). Ceci suggérerait que la motilité de la bactérie et la formation d'un biofilm¹¹ autour des jeunes racines jouerait un rôle important dans l'infection du pathogène.

La migration de *R. solanacearum* vers les racines des plantes pourrait s'expliquer de plusieurs manières décrites ci-après. Le chimiotactisme joue un rôle important dans les interactions plante/pathogène comme, par exemple, l'attraction des pathogènes via l'exsudation racinaire (Brenic et Winans, 2005). En particulier, les exsudats relâchés par les plantes de tomates attirent davantage la bactérie *R. solanacearum* que ceux de plantes non hôtes (Yao and Allen, 2006). Cette différence d'attraction varie en fonction des différentes plantes, mais aussi en fonction des différentes souches de *R. solanacearum* (Yao and Allen, 2006). L'autre possibilité de migration de la bactérie pourrait s'expliquer par l'aérotactisme. Aussi appelé énergie tactisme, l'aérotactisme représente le déplacement d'une bactérie vers un emplacement optimal pour son activité métabolique et en particulier près de la chaîne du transport des électrons (Taylor et al., 1999). Ce moyen d'attraction intervient pour de nombreuses bactéries et joue un rôle très important dans la

¹¹ Un biofilm est un assemblage de microorganismes enfermé dans une matrice extracellulaire de polymères qui adhère l'un à l'autre à une surface et s'adapte aux variations environnementales d'une manière sociale. Morris, C. E., and J. M. Monier, 2003, The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria: Annual review of phytopathology, v. 41, p. 429-53.

mobilité et le cycle de vie de ces bactéries (Taylor et al., 1999). Yao and Allen (2007) ont montré que *R. solanacearum* avait besoin de l'aérotactisme pour localiser rapidement une plante hôte et avoir un maximum de virulence. Ils ont, de plus, montré que la formation de biofilm sur des surfaces abiotiques était influencée par l'aérotactisme (Yao and Allen, 2007). Au vu de nos observations, la formation d'un biofilm autour des racines pourrait donc jouer un rôle dans l'interaction plantes/bactéries comme d'autres études l'avaient aussi suspecté (Morris and Monier, 2003). D'ailleurs, beaucoup d'associations plantes/bactéries se réalisent avec des biofilms en contact avec un environnement biotique (Morris and Monier, 2003). De plus, Yao et Allen (2006) ont aussi observé l'apparition d'un biofilm à la surface des jeunes racines de tomates. Par contre, les facteurs influençant la formation de ce biofilm ne sont pas encore connus. L'aérotactisme pourrait être un de ces facteurs, car la formation de ces biofilms s'est faite sur de jeunes racines qui présentent une plus grande activité métabolique.

Du point de vue du flétrissement bactérien, l'expérience servait à connaître la quantité à inoculer pour l'expérimentation principale. Seulement, les deux modalités où l'inoculation de RSol a eu lieu (10^2 CFU/ml et 10^4 CFU/ml) ne présentent pas de différences significatives. Même sans différences significatives, on peut remarquer que, le dernier jour, la valeur de flétrissement bactérien est plus importante pour 10^2 CFU/ml. Par contre, quand on observe les valeurs d'AUDPC, on remarque que ce sont les valeurs de l'inoculation à 10^4 CFU/ml qui sont les plus importantes. Cela signifierait donc que le flétrissement bactérien a eu lieu plus rapidement pour la concentration 10^4 CFU/ml. La concentration n'influencerait donc pas directement le flétrissement bactérien dans la durée de l'expérience, mais la rapidité avec laquelle la bactérie se dirige vers la plante hôte. Ceci paraît logique, car une plus grande concentration en bactérie augmente la probabilité qu'une bactérie atteigne la racine de la plante. La figure 24 montre que l'augmentation du flétrissement se fait plus vite pour la modalité 10^4 CFU/ml que pour la modalité 10^2 CFU/ml.

Dans cette expérience, l'effet du bloc (emplacements différents dans la chambre climatique) explique une grande partie de la variance. En regardant la figure 24, il semble que l'index de flétrissement soit supérieur dans le bloc 1 malgré cela l'effet bloc n'est pas significatif.

IV. 3^{ème} expérience : Évaluation in vitro du potentiel bioprotecteur des champignons mycorhiziens à arbuscules contre le flétrissement bactérien de la tomate

Les expériences I et II devaient permettre d'établir les conditions optimales d'une part de la colonisation racinaire par le CMA (exp I) et d'autre part de concentration de *R. solani* (exp II).

Si une colonisation racinaire par le CMA a effectivement été observée dans l'expérience I, celle-ci était limitée à quelques plantes et aucune dynamique n'a, dès lors, pu être réalisée. Cependant, d'autres expériences au laboratoire ont permis de déterminer une durée de 10 jours comme acceptable pour la durée de mycorhization. Par ailleurs, la reproduction de l'expérience n'a pu être réalisée en Martinique (au PRAM). En effet, les plants de *M. truncatula* dans le compartiment RC des systèmes MDP n'ont pas survécu et aucun réseau n'a pu être établi. Plusieurs hypothèses

peuvent être avancées liées aux conditions environnementales. Bien que les graines de luzerne utilisées proviennent d'Australie, la chaleur constante (jour et nuit) pourrait être à l'origine du mauvais développement des plantes. Les températures habituellement utilisées en environnement contrôlé ne dépassent pas les 21°C la nuit et les 25°C le jour (Barker et al., 2006). Avant la diminution de la température de la chambre climatique, la température pouvait atteindre 31°C le jour et 27°C la nuit. Cette très haute température pourrait avoir ralenti le développement de *M. truncatula*. Mais même après la diminution de température (jusqu'à 26°C la nuit et 29°C le jour), aucune amélioration des plantes n'a été observée. D'autres facteurs tels que l'humidité ou la photopériode (manque de lumière) pourraient avoir influencé le développement de la luzerne.

L'expérimentation II a permis de valider le protocole d'inoculation de *R. solanacearum* *in vitro*. Le choix a été fait d'inoculer 200µl de solution Rsol à 104 CFU/ml à la surface du gel SRM grâce à un râteau.

Il a donc été décidé de réaliser l'expérience avec des systèmes de culture *in vitro* HAM-P en boîtes de Petri mono-compartmentées. En nous basant sur une expérience réalisée sur la pomme de terre (Voets et al., 2005), nous espérions qu'après 6 semaines la mycorhization aurait eu lieu. Mais même si l'expérimentation I a montré que la mycorhization des plantes de tomates Heatmaster par MUCL43194 était effective, les taux de mycorhization sont restés faibles. De nombreuses raisons ont pu être à l'origine de ce résultat. Premièrement, le nombre de spores n'était pas toujours égal à 50, car l'inoculum de CMA n'était pas assez important. Ensuite, la température d'ajout du milieu était difficile à contrôler, car aucun dispositif pour conserver le milieu SRM à bonne température n'était présent. Il fallait donc sortir le milieu de l'étuve à 90°C puis le laisser refroidir sans connaître sa température avant de compléter les boîtes de Petri. La température idéale de remplissage (en dessous de 40°C) pour ne pas endommager les spores ou les racines n'a donc peut-être pas été respectée. Pour finir, les plantes de tomates Heatmaster ne mycorhizent peut-être pas aussi bien que les plantes de pomme de terre (Voets et al., 2005).

Même si le taux de mycorhization est faible, les données ont été séparées selon les quatre traitements (MYC+/R+, MYC-/R+, MYC+/R- et MYC-/R-). Aucune différence n'apparaît entre les modalités MYC+ et MYC- et cela même si l'on considère seulement les 10 plantes contenant quelques hyphes. Les différentes hypothèses de mécanismes évoquées par Harrier et Watson (2004) chez des plantes dans lesquelles la symbiose est fonctionnelle ne sont donc pas intervenues dans la protection de la plante. Le CMA n'ayant pas colonisé la plante, l'amélioration de la nutrition de la plante n'était pas possible, car les lieux d'échange (arbuscule) n'ont pas été observés. La compétition pour les sites d'échanges, l'altération de la structure de la racine et la modification des exsudats racinaires ne pouvaient pas non plus intervenir. Enfin, comme nous travaillons en milieu stérile aucune modification de la microflore du sol ne pouvait se réaliser. Les modifications systémiques de la plante ne l'ont pas non plus protégé contre le flétrissement bactérien. Les modifications systémiques induites par les CMA n'ont d'ailleurs pas dû intervenir, car le mécanisme d'amorçage (« priming ») qui serait à la base de la résistance systémique induite (Conrath, 2009; Van Wees et al., 2008) n'a pas pu avoir lieu. En effet, la résistance induite serait le résultat d'une sensibilisation des tissus qui seraient à même de répondre plus efficacement aux attaques pathogènes par une meilleure expression des mécanismes de défense de base (Jung et al., 2012). D'ailleurs, ces mécanismes seraient coordonnés avec le système immunitaire des plantes à l'instar du système immunitaire inné chez les animaux (Ausubel, 2005). La coordination se réaliserait avec de petites

molécules agissant comme transducteur sur l'expression des gènes (Ausubel, 2005) tels que l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA), acide abscisique et l'éthylène (Pieterse et al., 2009). En particulier, l'acide jasmonique et l'acide salicylique interviendraient aussi lors de la colonisation des racines de plantes par un CMA (Figure 32). Dans un premier temps, le CMA est reconnu comme un organisme étranger et la concentration en acide salicylique augmente (Dumas-Gaudot et al., 2000; Pozo et al., 1998). Une fois la symbiose établie, il y a diminution de SA (Dumas-Gaudot et al., 1996) (García-Garrido and Ocampo, 2002) et augmentation de l'acide Jasmonique (Hause and Schaarschmidt, 2009; Stumpe et al., 2005; Wasternack and Hause, 2002).

Pour savoir si une modification systémique a été induite dans l'une des modalités, on a donc analysé l'activité enzymatique de la lipoxygénase (13-LOX) et de la peroxydase. La lipoxygénase est le catalyseur intervenant lors de la première étape de synthèse du jasmonate (Feussner and Wasternack, 2002). L'acide jasmonique et ces dérivés, regroupés sous le nom de jasmonate, sont des phytohormones issues de la voie de biosynthèse des lipides. Comme décrits dans l'introduction et ci-dessus, l'acide jasmonique et ces dérivés seraient des régulateurs hormonaux très importants qui interviennent lors de stress biotique et abiotique (Wasternack and Hause, 2002). Cependant, dans notre expérience, la concentration en lipoxygénase est significativement la même pour toutes les modalités. Ceci suggère que la quantité de jasmonate dans les feuilles n'a pas augmenté lors de l'inoculation de la bactérie *R. solanacearum* même si l'effet de la maladie était visible. Cette bactérie n'induirait donc peut-être pas la synthèse de jasmonate lors de son infection ou sa synthèse ne serait pas localisée dans les feuilles. Le jasmonate fait partie des signaux activés lors de l'interaction avec des microorganismes (Pozo et al., 2004).

Des études ont montré en particulier que le niveau de jasmonate augmentait dans les racines de plantes mycorhizées par rapport à des plantes non mycorhizées (Hause and Schaarschmidt, 2009; Jung et al., 2012; Meixner et al., 2005; Stumpe et al., 2005; Wasternack and Hause, 2002) (Figure 32). Pourtant, les modalités MYC+ et MYC- n'ont pas influencé la quantité de lipoxygénase dans les feuilles. Il se pourrait que l'inoculation de CMA ne fasse augmenter la quantité de jasmonate que dans les racines de la plante (Jung et al., 2012; Stumpe et al., 2005). De plus, la mycorhization n'était peut-être pas assez importante pour influencer la concentration en lipoxygénase. L'infection de la plante de tomate par *R. solanacearum* n'induirait donc pas de réponse systémique par le jasmonate pour la défense de la plante.

D'un point de vue de l'activité enzymatique de la peroxydase, son augmentation dans la plante influence la production (augmente) des réactifs oxygénés intermédiaires (ROIs) (Grant and Loake, 2000; Hammond-Kosack and Jones, 1996). Les ROIs jouent un rôle important dans la défense des plantes face à l'infection de pathogènes (Grant and Loake, 2000; Hammond-Kosack and Jones, 1996; Mittler, 2002). D'ailleurs, leurs synthèses seraient, dans la plupart des cas, la première réaction de la plante face à ces pathogènes (Hammond-Kosack and Jones, 1996; Lamb and Dixon, 1997). Dans

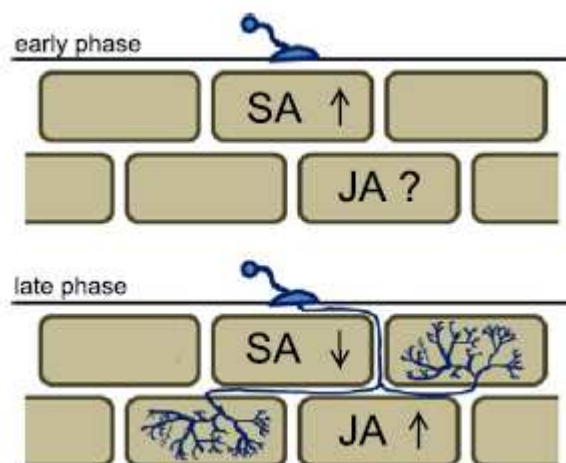


Figure 30 : Modèle des changements hormonaux associé à la colonisation d'une racine par un CMA (Jung et al., 2012)

notre expérience, l'augmentation de la peroxydase dans les feuilles était significative lors de l'inoculation de *R. solanacearum*. Ceci complèterait l'étude de Mandal et al.(2010) qui ont montré une augmentation des ROIs (H_2O_2) dans les racines des plantes de tomates inoculées avec la bactérie *R. solanacearum* (Mandal et al., 2011). Ces résultats suggéreraient donc une modification systémique induite par l'infection bactérienne menant à l'augmentation de l'activité enzymatique de la peroxydase. Les bactéries ont donc quand même induit une réponse systémique dans la plante. Par contre, les modalités MYC+ n'ont pas influencé la concentration en peroxydase des plantes. Une étude précédente (Blilou et al., 2000) a pourtant montré que l'augmentation de la peroxydase dans les racines, lors de l'inoculation d'un CMA, se réalisait lors de la formation de l'appressorium¹². Dans notre cas, le processus de mycorhization ne devait pas être suffisamment avancé pour qu'il y ait une augmentation significative de la concentration en peroxydase.

L'évolution du flétrissement bactérien en fonction du temps (Figure 28) est linéaire sur une période de 20 jours. Cette linéarité doit s'expliquer par un ou plusieurs facteurs limitant le flétrissement de la plante. Cela peut être dû au transport de la bactérie jusqu'à la racine, à l'introduction de la bactérie dans la plante ou encore au développement de la bactérie au sein de la plante. Dans notre cas, le déplacement de la bactérie dans le gel (principalement constitué d'eau) ne doit pas être limitant, car l'eau est un endroit privilégié pour le déplacement de *R. solanacearum* (Tans-Kersten et al., 2001). L'introduction et/ou le développement de la bactérie dans la plante seraient donc le/les facteur(s) limitant(s) l'induction du flétrissement bactérien.

Au bout de 18 jours, l'entièreté (24/24) des plantes inoculée (R+) avec *R. solanacearum* était flétrie. Cette nouvelle souche bactérienne possède donc une grande virulence, car la variété de tomate Heatmaster avait été choisie par les agriculteurs martiniquais pour sa résistance naturelle à *R. solanacearum*.

V. Méthode d'évaluation : Index de flétrissement (DI) et pourcentage de plantes flétries (PWP)

Au vu des analyses statistiques, ces deux méthodes d'évaluation se basant sur deux échelles différentes donnent des résultats très similaires (profils de prévision (Figure 25,27), graphiques de l'évolution de l'Arcsin (« flétrissement ») en fonction des jours (Figure 24 et 26)). Ces derniers sont très intéressants pour comparer ces deux méthodes. On peut ainsi remarquer 3 grandes différences entre les courbes de l'index de flétrissement (DI) et les courbes du pourcentage de plante flétries (PWP). Premièrement, les courbes de l'index de flétrissement (DI) sont plus « lisses » que celle du pourcentage de plantes flétries (PWP). Cela s'explique facilement, car l'échelle avec le moins d'échelons donne moins de résultats différents et donc cela engendre une plus grande discontinuité. Inversement, les résultats obtenus avec l'échelle de He (1983) (DI) sont plus « continus ». Pour obtenir le même profil avec l'échelle PWP, il faudrait réaliser le test sur un nombre de plantes plus important. Deuxièmement, les courbes PWP sont strictement croissantes alors que les courbes DI

¹² Appressorium : « L'Appressorium est un système utilisé par les champignons pour pénétrer dans une cellule hôte (plante): après la sporulation, le spore va adhérer à la surface de la plante et va germer. Cela mène à la formation d'un appressorium, qui en exerçant une pression mécanique va rentrer par force à l'intérieur de la cellule et donc la coloniser ». <http://fr.wikipedia.org/wiki/Appressorium>

peuvent décroître. L'échelle de He (1983) (DI) est plus subjective que l'échelle du PWP, car un léger stress de la plante non lié au flétrissement peut influencer son niveau sur l'échelle. Ainsi, une plante sur le 3^{ème} échelon de He (1983) peut le lendemain être sur le 2^{ème} échelon. L'échelle du PWP ne tient compte que des plantes se trouvant dans un état de flétrissement avancé sans possibilité de « retour en arrière ». Enfin, la dernière différence, directement liée à la deuxième, se situe dans les témoins. Alors que ceux de l'échelle du DI varient, mais restent stables, ceux de l'échelle du PWP sont constamment égaux à zéro. Comme pour vu précédemment, les témoins restent à zéro, car l'échelle du PWP tient compte uniquement des plantes réellement flétries et non des stress divers que les plantes auraient pu subir.

En comparant les valeurs des AUDPC, les valeurs de l'échelle DI sont significativement supérieures aux valeurs de l'échelle PWP. L'échelle de He (1983) (DI) prend en compte des plantes qui ne sont peut-être pas encore atteintes et donc cela pourrait entraîner une surévaluation de l'incidence de la maladie. À l'inverse, l'échelle PWP peut ne pas tenir compte de plantes qui sont déjà infectées, mais où le flétrissement n'est pas encore important.

Même si l'échelle de He (1983) (DI) semble faussée, car elle peut tenir compte de plantes qui ne sont pas réellement atteintes, elle possède quand même des avantages par rapport à l'échelle du PWP. Tout d'abord, l'évolution de la maladie est plus linéaire et les modèles statistiques qui lui sont associés sont meilleurs. En effet, même si les R^2 des deux échelles sont similaires, le graphique des résidus de l'échelle de He (1983) est meilleur, car les valeurs des témoins varient (trois points identiques pour l'échelle PWP). Les valeurs des témoins nuls engendrent une mauvaise répartition de la variance du modèle. Comme on peut le voir sur le graphe du profil des prévisions (Figure 25), le modèle tient compte d'une variance moyenne (en bleu sur le graphe) sur tous les traitements alors qu'en réalité le témoin ne varie pas.

Les échelles étant similaires, même si l'échelle de He (1983) risque de surestimer l'incidence de la maladie, son utilisation semble préférable pour l'analyse statistique des résultats.

Conclusion et perspectives

Après les analyses enzymatiques et la coloration, il semble évidemment que les CMA n'ont joué aucun rôle visible et n'ont pas interagi significativement avec les plantes. Aucune information ne peut être donc être utilisée pour prouver ou réfuter le potentiel bioprotecteur des CMA face à *Ralstonia solanacearum*. L'expérience ne fut pas concluante, car les protocoles expérimentaux utilisés n'étaient pas adaptés. En effet, l'association entre les plants de tomates Heatmaster et les plants de *M. truncatula* n'est pas optimale puisque ces deux plantes ne poussent visiblement pas dans les mêmes conditions environnementales. L'expérience I et l'expérience III devraient donc être renouvelées en utilisant une autre plante et d'autres conditions environnementales pour multiplier les CMA. *M. truncatula* pourrait par exemple être remplacée par *Crotalaria spectabilis* qui a montré une bonne mycorhization (Germani and Plenchette, 2005) et qui se développe dans les conditions de culture *in vitro* du PRAM. L'utilisation d'un autre système de culture *in vitro* est aussi possible.

Par contre, le protocole d'inoculation de la bactérie *R. solanacearum* sur les plants de tomates a été validé. Pour obtenir un flétrissement bactérien pratiquement complet des plantes de tomates Heatmaster en culture *in vitro* étalé sur une période de ± 18 jours, il faut étaler 200 μ l d'une solution de Rsol 10⁴CFU/ml sur la surface du milieu SRM. L'évaluation *in vitro* du flétrissement bactérien a aussi permis d'observer le déplacement de la bactérie à l'intérieur du gel. Le développement de la bactérie se réalise préférentiellement autour des jeunes racines. Une des raisons avancées serait la capacité des bactéries de se déplacer vers des endroits propices à une meilleure activité métabolique (aérotactisme)(Yao and Allen, 2007).

Pour évaluer le flétrissement bactérien des plantes de tomates, deux échelles ont été confrontées. L'échelle de He (1983) semble la plus facilement exploitable, car l'évolution du flétrissement semble plus « continue » et les modèles statistiques sont plus adaptés. Par contre, une plus grande place est donnée à l'objectivité lors de l'observation des plantes et l'incidence de la maladie peut-être surévaluée. L'échelle du pourcentage de plantes flétries (PWP) est beaucoup plus objective, mais moins facilement manipulable d'un point de vue statistique. De plus, cette échelle est moins « continue ».

Des expériences complémentaires seront donc nécessaires pour pouvoir évaluer *in vitro* le pouvoir bioprotecteur des CMA face au flétrissement bactérien de la tomate. Il faudra tout d'abord trouver une plante capable de développer les mycorhizes dans les mêmes conditions de culture que la plante de tomate Heatmaster pour pouvoir évaluer la dynamique de colonisation du plant de tomate. Ensuite, lors de l'évaluation du potentiel bioprotecteur des CMA, le protocole d'inoculation de la bactérie *R. solanacearum* décrit ci-dessus pourra être utilisé. Pour la facilité de l'analyse statistique, l'échelle de He (1983) sera préférentiellement utilisée. Ce travail aura donc permis de préciser le protocole à mettre en place dans le futur pour évaluer le potentiel bioprotecteur des CMA sur le flétrissement bactérien de la tomate.

Annexes

I. Annexes : Milieu SRM (Modified Strullu Romand)

A. Utilisation :

Le milieu SRM que l'on utilise dans les manipulations vient de la modification par Declerck et al. (Declerck et al., 1998) du milieu réalisé précédemment par Strullu et Romand en 1986 (Strullu and Romand, 1986).

Le milieu modifié de Strullu et Romand (SRM) est le plus répandu dans la culture *in vitro* des champignons mycorhiziens arbusculaires (CMA). L'utilisation de ce milieu facilite la normalisation de la culture *in vitro* des CMA.

B. Matériaux

- Ballon jaugé
- Autoclave
- Pipette graduée
- Propipette
- Agitateur magnétique
- Balance

C. Composition

- Les éléments minéraux se trouvant dans le milieu sont repris dans le tableau 5. (Le milieu SRM est préparé à partir de 4 solutions différentes avec les compositions reprises dans le tableau 6)
- Phytigel ou Gelrite
- NaOH /HCl

Tableau 5 : Composition du milieu Modifié Strullu-Romand (SRM) en minéraux [μM] (Fortin et al., 2002).

	MSR (μM)
$\text{N}(\text{NO}_3^-)$	3800
$\text{N}(\text{NH}_4^+)$	180
P	30
K	1650
Ca	1520
Mg	3000
S	3013
Cl	870
Na	20
Fe	20
Mn	11
Zn	1
B	30
I	—
Mo	0.22
Cu	0.96

Tableau 6 : Composition des différentes solutions stocks intervenant dans l'élaboration du milieu SRM (Fortin et al., 2002)

Solution stock de macroéléments (g/l)		Solution stock de microéléments (g/l)		Solution de nitrate de calcium (g/l)		NaFeEDTA (g/l)	
KNO ₃	7,6	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2,45	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	35,9	NaFeEDTA	1,6
KCl	6,5	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,28				
KH ₂ PO ₄	0,41	H ₃ BO ₃	1,85				
MgSO ₄ ·7H ₂ O	73,9	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,22				
		(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,034				
		Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0024				

D. Méthodes

1. Mélanger dans un ballon jaugé de 1l :
 - a. 10 ml de solution de macroéléments
 - b. 10 ml de solution de nitrate de calcium
 - c. 5 ml de solution de NaFeEDTA
 - d. 1 ml de solution de microéléments
 ➔ Porter au trait de jauge
2. Homogénéiser avec un agitateur magnétique
3. Ajuster le pH à 5,50 ± 0,05
4. Ajouter 3 g/l de Phytigel ou Gelrite
5. Dissoudre le gélifiant en portant la solution à ébullition sur l'agitateur magnétique chauffant.
6. Autoclaver la solution 15 min à 121 °C et 1 bar de pression
7. Utiliser la solution directement ou l'entreposer dans une étuve (40 °C - 60 °C)

Cette solution peut se conserve jusqu'à 4 jours dans l'étuve.

II. Annexe : Association entre racine et spores de CMA (Declerck et al., 2012)

1. "Spore/root association"

The main objective of this session is to associate the germinated propagules as soon as the germination is observed in order to avoid damage of the newly formed hyphae and to increase the success of the association.



The germination of spores and sporocarps often occurs in a period varying between 2 and 30 days after the disinfection procedure

The germination of mycorrhizal root fragments usually occurs within 2 to 15 days from the cut their extremities.

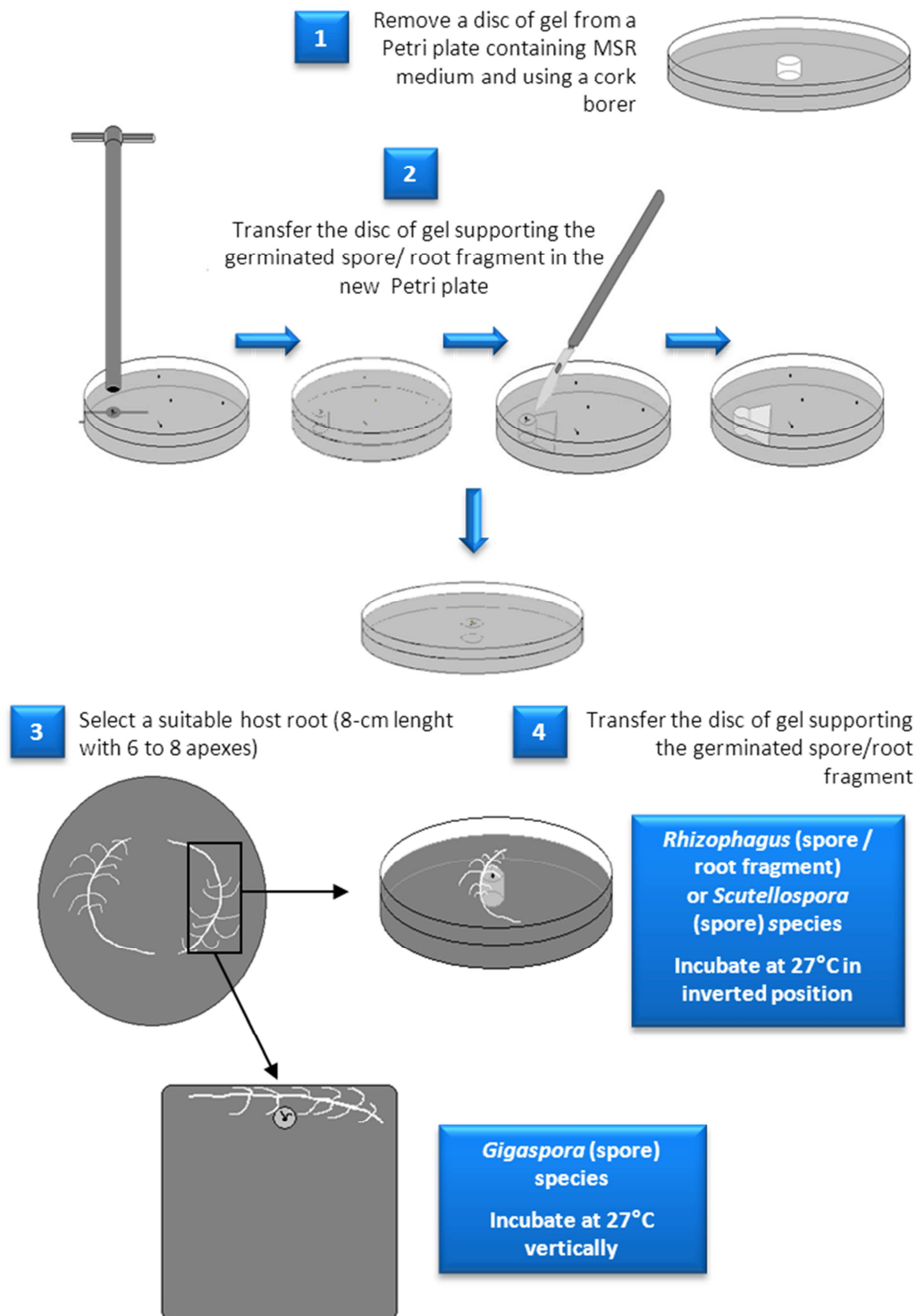
Supervisor:

Céline Bivort

Technician

celine.bivort@uclouvain.be

Spore/root association



Equipment

- *Laminar flow hood*
- *Stereo-microscope*
- *Cooled heated incubator*
- *Bunsen burner or bead sterilizer*

Laboratory material

- *Sterile Petri plates (90 mm diameter and 120 x 120 mm)*
- *Forceps*
- *Scalpels*
- *Cork borer (5 to 25 mm diameter)*
- *Plastic wrap (2 cm-large roll). Note that Seal View™, Petri Seal™ or other products can also be used.*

Medium

- *Autoclaved (121°C for 15 min.) SRM medium, solidified with 3 g.l⁻¹ Phytigel™ and 10 g.l⁻¹ sucrose (see Annex I for preparation)*

Biological material

- *Disinfected spores, sporocarps or root fragments*
- *Transformed carrot (*Daucus carota*) roots clone DC2 (Bécard and Fortin, 1988).*
- *Transformed chicory (*Cichorium intybus*) roots clone A4NH (Fontaine et al., 2004)*
- *Transformed *Medicago truncatula* roots*

Association Methods

1. *Select a host root of 8 cm length with few apices forming a herringbone structure from a 2-3 weeks old root organ culture (see also Chap. 5 – Selecting roots for association).*
2. *If the inoculum is a spore or root fragment (since five spores or root fragments were placed in the same plate for germination):*

a) From a Petri plate filled with the SRM medium, remove a disc of medium with a cork borer. This disc should be identical in size to the disc of gel supporting the germinated spore.

For *Rhizophagus* and *Scutellospora*, the disc of gel should be removed from the centre of a mono-compartmental Petri plate (90 mm diameter) or from the centre of the proximal compartment of a bi-compartmental system (for *Rhizophagus*).

For *Gigaspora* species, the disc of gel should be removed from the centre of the upper part of a square mono-compartmental Petri plate (120 x 120 mm). The diameter of the disc should be large enough to include the spore and germinating hyphae (9 mm diameter is usually enough).

b) Transfer the disc of gel supporting the germinated spore of *Rhizophagus* and *Scutellospora* or *Gigaspora* into the hole of the removed disc.

3. Place the root carefully in the vicinity of the propagule (spore, sporocarp or mycorrhized root fragment) into the Petri plate, so that the growing hyphae are perpendicular to a secondary root.
4. Seal the Petri plates with plastic wrap and incubate them in an inverted position at 27°C in the dark for the *Rhizophagus* and *Scutellospora* species in mono- or bi-compartmental systems. The *Gigaspora* cultivated in a square Petri plate has to be incubated vertically (root in the upper part) at 27°C in the dark."

III. Annexe : Préparation d'un inoculum titre (Coranson-Beaudu et al., 2010)

A. «Principe de la méthode

Il s'agit de repiquer des souches bactériennes pour multiplication et préparation d'un inoculum de titre connu. La purification des souches se fait sur un milieu semi-sélectif et la préparation de l'inoculum se fait à partir de souches préalablement multipliées sur milieu CPG.

B. Abréviations

CFU : Colony Forming Unit	SMSA : Seiquera Modifié South Africa
CPG : Casmino acide, Peptone, Glucose	DO : Densité Optique

C. Moyens employés

1. Le matériel (en spécifiant le matériel critique)

Le matériel critique est identifié par (*)

- Öses de 10 µl*(inoculateur à boules)
- Flacon stérile de 40 mL
- Tubes à hémolyse
- Pipettes et micropipettes*
- Flacons et éprouvettes en verre stérile*
- Spectrophotomètre et cuves à spectrophotomètre*
- Étuve*
- Vortex
- Parafilm™
- Boîtes de Petri
- Les réactifs (en spécifiant les réactifs critiques)
- Eau distillée stérile*
- Tampon Tris pH 7.2
- Boîte de Petri de CPG*
- Boîtes de Petri de SMSA
- Souche bactérienne de référence*

2. Étalons et calibrage

Le zéro du spectrophotomètre se fait avec du tampon Tris ou de l'eau distillée stérile

D. Processus opératoire

1. Étalement de purification

Purification de la souche se fait au moins 3 jours avant l'inoculation.

La souche provient soit du congélateur à -80 °C, soit d'une suspension bactérienne stockée au réfrigérateur, soit d'une culture sur milieu gélosé.

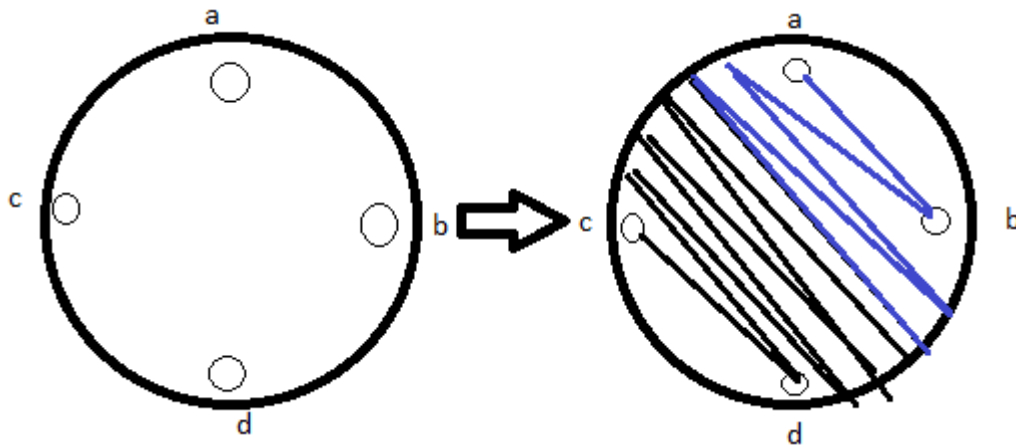
1 öse de 10 µL est étalée sur milieu semi-sélectif (SMSA) en 3 secteurs afin d'obtenir sur le 3^{ème} secteur des colonies bien isolées.

2. Étalement de multiplication

À partir d'une souche pure, prélever 1 grosse öse (10 µL) de colonies et la déposer sur milieu CPG au coin (a) de la boîte. Renouveler l'opération 3 fois en déposant les colonies aux coins opposés (b, c et d).

Rejoindre les points (a) et (b) et étaler sur la moitié de la boîte. Répéter la même opération pour les points (c) et (d) sur l'autre moitié de la boîte.

Incuber à l'étuve 1 à 2 jours à 28 °C.



3. Préparation de l'inoculum au laboratoire

a) Grattage des boîtes d'inoculum (CPG, 1 jour de croissance à 28 °C)

- Injection de 5 ml de Tris ou d'eau distillée stérile dans une boîte
- Grattage avec une spatule stérile
- Transfert dans une 2^{ème} boîte, et ajout de 5 ml de Tris ou d'eau distillée stérile
- Grattage de la 2^{ème} boîte
- Récupération des 10 ml de suspension dans un flacon stérile de 40 mL

L'opération peut être renouvelée plusieurs fois en fonction du nombre de boîtes mères et de la quantité d'inoculum souhaitée.

b) Dilution de la suspension mère au 1/50^{ème}

Dans un tube hémolyse mettre 4,9 ml de tampon Tris ou d'eau distillée stérile, puis ajouter 100 µL de suspension brute bien homogénéisée. Vortexer pour homogénéiser.

c) Dosage de la suspension au spectrophotomètre

La suspension est transférée dans une cuve à spectrophotomètre, qu'on bouche par un morceau de ParafilmTM. Chaque cuve est ensuite posée dans une boîte en plastique fermée.

d) Mesure de l'absorbance

La mesure de l'absorbance se fait à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 600 nm.

L'étalonnage du zéro se fait avec le Tris ou de l'eau distillée stérile

La valeur d'absorbance (DO) est notée

e) Préparation des suspensions d'inoculation

Calculer le nombre total de CFU dont on a besoin par récipient. Puis en déduire le volume suspension mère à ajouter et le volume d'eau.

E. Expression des Résultats

1. Les critères de validation

- La $DO \geq 1$, les calculs de concentration ne sont pas valides. Il faut alors diluer de nouveau la suspension mère à ajouter et le volume d'eau

2. Les calculs

- À 600 nm une $DO = 1$ correspond à environ 10^9 CFU/ml,
Pour obtenir le titre de la suspension mère en CFU/ml, appliquer la formule :

$$\text{Titre} = DO \times 10^9 \times 50 \text{ (facteur dilution)}$$

Calcul pour la préparation d'une suspension d'inoculation :

Exemple : On prépare 250 ml à 10^8 CFU/ml. Dans les 250 ml, on a donc besoin de $2,5 \times 10^{10}$ CFU. Or notre suspension mère **S** a un titre de 5×10^9 CFU/ml.

D'où :

$$\begin{aligned} \text{Solution mère à ajouter (ml)} &= \frac{\text{CFU dont ont a besoin}}{\text{Concentration de la solution mère}} = \frac{2,5 \times 10^{10} \text{ CFU}}{5 \times 10^9 \frac{\text{CFU}}{\text{ml}}} \\ &= 5 \text{ ml de solution mère} \end{aligned}$$

D'où : 250 ml de suspension = 5 ml de **S** + 245 ml d'eau stérile.

3. La limite de détection

Le spectrophotomètre mesure des absorbances entre 190 et 1100 nm. On ne peut pas doser une suspension avec une DO supérieure à 1 (cf. « critères de validation »)

F. Commentaires- Remarques

Ces suspensions sont utilisées lorsque l'on veut contaminer artificiellement un sol ou de l'eau, pour des essais de méthodologie d'extraction de microorganismes ou de tests de pathogénicité sur plante ou tout autre essai. »

Références bibliographiques

- Adhikari, T. B., and R. C. Basnyat, 1998, Effect of crop rotation and cultivar resistance on bacterial wilt of tomato in Nepal: Canadian journal of plant pathology. *Revue Canadienne de phytopathologie.*, v. 20, p. 283.
- Akköprü, A., and S. Demir, 2005, Biological Control of Fusarium Wilt in Tomato Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* by AMF *Glomus intraradices* and some Rhizobacteria: *Journal of Phytopathology*, v. 153, p. 544-550.
- al, B. e., Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as well as Lipid, *American Society of Plant Biologists*.
- Ano, G., G. Anais, and A. Chidiac, 2002, Creation de varietes resistantes aux maladies en Guadeloupe Elements indispensables de diversification agricole: PHYTOMA, p. 36-37.
- Ausubel, F. M., 2005, Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?: *Nature immunology*, v. 6, p. 973-9.
- Azcon Aguilar, C., and J. M. Barea, 1996, Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil borne plant pathogens an overview of the mechanisms involved: *MYCORRHIZA*, v. 6, p. 457-464.
- Azcon, R., M. Gomez, and R. Tobar, 1996, Physiological and nutritional responses by *Lactuca Sativa* L. to nitrogen sources and mycorrhizal fungi under drought conditions: *Biology and fertility of soils.*, v. 22, p. 156.
- Bago, B., C. Azcón-Aguilar, and Y. Piché, 1998, Architecture and Developmental Dynamics of the External Mycelium of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus intraradices* Grown under Monoxenic Conditions: *Mycologia*, v. 90, p. 52-62.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, J. Abubaker, J. Jun, J. W. Allen, J. Brouillette, D. D. Douds, P. J. Lammers, and Y. Shachar-Hill, Carbon Export from Arbuscular Mycorrhizal Roots Involves the Translocation of Carbohydrate as well as Lipid, *American Society of Plant Biologists*.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, and Y. Shachar-Hill, 2000, Carbon Metabolism and Transport in Arbuscular Mycorrhizas: *Plant Physiology*, v. 124, p. 949-957.
- Bago, B., P. E. Pfeffer, W. Zipfel, P. Lammers, and Y. Shachar-Hill, 2002, Tracking metabolism and imaging transport in arbuscular mycorrhizal fungi. *Metabolism and transport in AM fungi: Plant and Soil*, v. 244, p. 1-2.
- Bansal, M., and K. G. Mukerji, 1994, Positive correlation between VAM-induced changes in root exudation and mycorrhizosphere mycoflora: *Mycorrhiza Mycorrhiza*, v. 5, p. 39-44.
- Barker, D. G., T. Pfaff, D. Moreau , E. Groves, S. Ruffel, M. Lepetit, S. Whitehand, F. Maillet, R. M. Nair, and E.-P. Journet, 2006, Growing *M. truncatula*: choice of substrates and growth conditions, <http://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/GrowingMedicagotruncatula.pdf>, *Medicago truncatula handbook*.
- Bergey, D. H., R. E. Buchanan, N. E. Gibbons, and M. American Society for, 1975, *Bergey's manual of determinative bacteriology*: Baltimore, Williams & Wilkins Co.
- Blaszkowski, J., B. Czerniawska, T. Wubet, T. Schafer, F. Buscot, and C. Renker, 2008, *Glomus irregulare*, a new arbuscular mycorrhizal fungus in the Glomeromycota: *Mycotaxon Mycotaxon*, v. 106, p. 247-267.
- Blilou, I., P. Bueno, J. A. Ocampo, and J. M. García-Garrido, 2000, Induction of catalase and ascorbate peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal *Glomus mosseae*: *Mycological Research*, v. 104, p. 722-725.
- Boedker, L., R. Kjoeller, and S. Rosendahl, 1998, Effect of phosphate and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* on disease severity of root rot of peas (*Pisum sativum*) caused by *Aphanomyces euteiches*: *MYCORRHIZA*, v. 8, p. 169-174.

- Bowen, G. D., and A. D. Rovira, 1999, The Rhizosphere and its Management to Improve Plant Growth: ADVANCES IN AGRONOMY, v. 66, p. 1-102.
- Brencic, A., and S. C. Winans, 2005, Detection of and Response to Signals Involved in Host-Microbe Interactions by Plant-Associated Bacteria: Microbiology and Molecular Biology Reviews Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 69, p. 155-194.
- Buddenhagen, I., and A. Kelman, 1964, Biological and Physiological Aspects of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*: Annu. Rev. Phytopathol. Annual Review of Phytopathology, v. 2, p. 203-230.
- Butcher, D. N., and H. E. Street, 1964, Excised Root Culture: The Botanical Review, v. 30, p. 513-586.
- Bååth, E., and D. S. Hayman, 1983, Plant Growth Responses to Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza. XIV. Interactions with *Verticillium* Wilt on Tomato Plants: New Phytologist, v. 95, p. 419-426.
- Bécard, G., and J. A. Fortin, 1988, Early Events of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Formation on Ri T-DNA Transformed Roots: New Phytologist, v. 108, p. 211-218.
- Cai, Y. f., S. q. Zhao, Z. w. Liao, C. x. He, and X. y. Zhuang, 2003, Effect of Fertilization on Tomato Bacterial Wilt Biocontrolling and Soil Health Restoration Using FAME Analysis: AGRICULTURAL SCIENCES IN CHINA, v. 2, p. 779-785.
- Campbell, C. L., and L. V. Madden, 1990, Introduction to plant disease epidemiology: New York, Wiley.
- Cano, C., S. Dickson, M. Gonzalez-Guerrero, and A. Bago, 2008, In vitro cultures open new prospects for basic research in arbuscular mycorrhizas, Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco-Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics, p. pp.627-654.
- Cardoso, S. C., 2006, Control of tomato bacterial wilt through the incorporation of aerial part of pigeon pea and crotalaria to soil: Summa Phytopathologica, Botucatu, v. 32, p. 27-33.
- Caron, M., 1989, Potential use of mycorrhizae in control of soil-borne diseases: Canadian Journal of Plant Pathology Canadian Journal of Plant Pathology, v. 11, p. 177-179.
- Caron, M., J. A. Fortin, and C. Richard, 1985, Influence of substrate on the interaction of *Glomus intraradices* and *Fusarium oxysporum* f.sp.*radicis-lycopersici* on tomatoes: Plant Soil Plant and Soil, v. 87, p. 233-239.
- Caron, M., J. A. Fortin, and C. Richard, 1986, Effect of Inoculation Sequence on the Interaction between *Glomus intraradices* and *Fusarium Oxysporum* f. sp.*Radici-Lycopersici* in Tomatoes: Canadian Journal of Plant Pathology Canadian Journal of Plant Pathology, v. 8, p. 12-16.
- Cason, K. M., R. S. Hussey, and R. W. Roncadori, 1983, Interaction of Vesicular-arbuscular Mycorrhizal Fungi and Phosphorus with *Meloidogyne incognita* on Tomato: Journal of nematology, v. 15, p. 410-7.
- Cassells, A. C., G. L. Mark, and C. Periappuram, 1996, Establishment of arbuscular mycorrhizal fungi in autotrophic strawberry cultures in vitro. Comparison with inoculation of microplants in vivo: Agronomie., v. 16, p. 625.
- CESAMM/GINCO, 2012, International training on in vitro culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, UCL – ELI - Mycology.
- Conrath, U., 2009, Chapter 9 Priming of Induced Plant Defense Responses, *in* L. C. V. Loon, ed., Advances in Botanical Research, v. Volume 51, Academic Press, p. 361-395.
- Coranson-Beaudu, R., P. Deberdt, and C. Chabrier, 2010, PHYTOPATHOLOGIE Agrément NS2 : Préparation d'un inoculum titré, Cirad.
- Cordier, C., S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson, 1996, Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato: Plant and Soil, v. 185, p. 223-232.
- Cordier, C., M. J. Pozo, J. M. Barea, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson, 1998, RESEARCH - Cell Defense Responses Associated with Localized and Systemic Resistance to *Phytophthora parasitica* Induced in Tomato by an Arbuscular Mycorrhizal Fungus: Molecular plant-microbe interactions : MPMI., v. 11, p. 1017.

- Dalal, N. R., S. R. Dalal, V. G. Golliwar, and R. I. Khobragade, 1999, Studies on grading and pre-packaging of some bacterial wilt resistant brinjal (*Solanum melongena* L.) varieties., *Journal of Soils and Crops* p. 223-226.
- Dalpé, Y., S. Cranenbrouck, S. Séguin, and S. Declerck, 2005, The monoxenic culture of arbuscular mycorrhizal fungi as a tool for systematics and biodiversity *in* S. Declerck, D. G. Strullu, and J. A. Fortin, eds., *In vitro Culture of Mycorrhizas*, p. 31-48.
- Dalpé, Y., and S. Declerck, 2002, Development of *Acaulospora rehmii* Spore and Hyphal Swellings under Root-Organ Culture: *Mycologia*, v. 94.
- Davis, R. M., and J. A. Menge, 1980, Influence of *Glomus fasciculatus* and soil phosphorus on *Phytophthora* root rot of citrus: *Phytopathology*, v. 70, p. 447-452.
- de Souza, F. A., and S. Declerck, 2003, Mycelium Development and Architecture, and Spore Production of *Scutellospora reticulata* in Monoxenic Culture with Ri T-DNA Transformed Carrot Roots: *Mycologia*, v. 95, p. 1004-1012.
- De Souza, F. A., S. Declerck, E. Smith, and K. GA, 2005, Morphological, ontogenetic and molecular characterization of *Scutellospora reticulata* (Glomeromycota): *Mycological Research*, New York, v. 109, p. 697-706.
- De Vos, M., V. R. Van Oosten, R. M. Van Poecke, J. A. Van Pelt, M. J. Pozo, M. J. Mueller, A. J. Buchala, J. P. Métraux, L. C. Van Loon, M. Dicke, and C. M. Pieterse, 2005, Signal signature and transcriptome changes of *Arabidopsis* during pathogen and insect attack: *Molecular plant-microbe interactions : MPMI*, v. 18, p. 923-37.
- Deberdt, P., B. Perrin, R. Coranson-Beaudu, P. Duyck, and E. Wicker, 2012, Effect of *Allium fistulosum* extract on *Ralstonia solanacearum* populations and tomato bacterial wilt: *Plant Dis. Plant Disease*, v. 96, p. 687-692.
- Deberdt, P., P. Quénehervé, A. Darrasse, and P. Prior, 1999, Increased susceptibility to bacterial wilt in tomatoes by nematode galling and the role of the Mi gene in resistance to nematodes and bacterial wilt: *Plant Pathology*, v. 48, p. 408-414.
- Declerck, S., 2011, Cours de Morphologie et Physiologie des Mycètes, LBIO1213.
- Declerck, S., C. Buysens, S. Cranenbrouck, H. Dupré de Boulois, A. A. Arnaud Sipel, C. Bivort, C. Coretta Oye Anda, F. Ferrais, I. Lalaymia, K. Plouznikoff, P.-L. Alaux, T. Sosa-Rodriguez, V. Potten, and V. Moreau, 2012, International training on in vitro culture of Arbuscular Mycorrhizal Fungi, UCL – ELI - Mycology.
- Declerck, S., S. Cranenbrouck, Y. Dalpé, S. Séguin, A. Grandmougin-Ferjani, J. Fontaine, and M. Sancholle, 2000, *Glomus proliferum* sp. nov.: A Description Based on Morphological, Biochemical, Molecular and Monoxenic Cultivation Data: *Mycologia*, v. 92, p. 1178-1187.
- Declerck, S., D. D'or, S. Cranenbrouck, and E. Le Boulenge, 2001, Modelling the sporulation dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in monoxenic culture: *Mycorrhiza Mycorrhiza*, v. 11, p. 225-230.
- Declerck, S., D. G. Strullu, and J. A. Fortin, 2005, *In vitro culture of mycorrhizas*, Berlin; New York, Springer.
- Declerck, S., D. G. Strullu, and C. Plenchette, 1996, In vitro mass-production of the arbuscular mycorrhizal fungus, *Glomus versiforme*, associated with Ri T-DNA transformed carrot roots: *Mycological Research*, v. 100, p. 1237-1242.
- Declerck, S., D. G. Strullu, and C. Plenchette, 1998, Monoxenic Culture of the Intraradical Forms of *Glomus* sp. Isolated from a Tropical Ecosystem: A Proposed Methodology for Germplasm Collection: *Mycologia*, v. 90, p. 579-585.
- Denny , T. P. H., AC, 2001, Gram négative bacteria, *in* N. W. Schaad, J. B. Jones, and W. Chun, eds., *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria* p. 151-174.
- Diedhiou, P. M., J. Hallmann, E. C. Oerke, and H. W. Dehne, 2003, Effects of arbuscular mycorrhizal fungi and a non-pathogenic *Fusarium oxysporum* on *Meloidogyne incognita* infestation of tomato: *Mycorrhiza*, v. 13, p. 199-204.
- Dixon, R. K., H. E. Garrett, and G. S. Cox, 1989, Boron fertilization, vesicular-arbuscular mycorrhizal colonization and growth of citrus jambhiri lush: *Journal of Plant Nutrition*, v. 12, p. 687-700.

- Dumas-Gaudot, E., A. Gollotte, C. Cordier, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson, 2000, Modulation of host defence systems: Arbuscular mycorrhizas : physiology and function, p. 173-200.
- Dumas-Gaudot, E., S. Slezacek, B. Dassi, M. J. Pozo, V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi, 1996, Plant hydrolytic enzymes (chitinases and β -1,3-glucanases) in root reactions to pathogenic and symbiotic microorganisms: *Plant Soil Plant and Soil*, v. 185, p. 211-221.
- Dupré de Boulois, H., B. Delvaux, and S. Declerck, 2005, Effects of arbuscular mycorrhizal fungi on the root uptake and translocation of radiocaesium: *Environmental Pollution Environmental Pollution*, v. 134, p. 515-524.
- Dupré de Boulois, H., L. Voets, B. Delvaux, I. Jakobsen, and S. Declerck, 2006, Transport of radiocaesium by arbuscular mycorrhizal fungi to *Medicago truncatula* under in vitro conditions: *Environmental Microbiology*, v. 8, p. 1926-1934.
- Elmeskaoui, A., J.-P. Damont, M.-J. Poulin, Y. Piché, and Y. Desjardins, 1995, A tripartite culture system for endomycorrhizal inoculation of micropropagated strawberry plantlets in vitro: *Mycorrhiza*, v. 5, p. 313-319.
- Elphinstone, J., C. Allen, P. Prior, and A. C. Hayward, 2005, Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex: The current bacterial wilt situation : a global overview: St. Paul, Minn., American Phytopathological Society.
- Elphinstone, J. G., J. Hennessy, J. K. Wilson, and D. E. Stead, 1996, Sensitivity of different methods for the detection of *Ralstonia solanacearum* in potato tuber extracts: *EPPO Bulletin*, v. 26, p. 663-678.
- Farag, N. S., S. M. Lashin, R. S. All-Abdel, H. M. Shatta, and A. M. Seif-Elyazal, 1982, Antibiotics and control of potato black leg and brown rot diseases *Agricultural Research Review*, p. 149-166.
- Fernandes, P., P. Deberdt, M. Chave, Sire-dhiedou., S. Minatchi, R. Coranson-Beaudu, and E. Goze, 2012, Des plantes assainissantes candidates pour réduire le flétrissement bactérien de la tomate dans les conditions de la Martinique., *Cahier du PRAM*.
- Feussner, I., and C. Wasternack, 2002, The lipoxygenase pathway, p. 275-297.
- Finlay, R., 2007, Ecological aspects of mycorrhizal symbiosis -- With special emphasis on the functional diversity of interactions involving the extraradical mycelium: *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology.*, v. 146, p. S220.
- Fortin, J. A., G. Bécard, S. Declerck, Y. Dalpé, M. St-Arnaud, A. P. Coughlan, and Y. Piché, 2002, Arbuscular mycorrhiza on root-organ cultures: *Can. J. Bot. Canadian Journal of Botany*, v. 80, p. 1-20.
- Fritz, M., I. Jakobsen, M. Lyngkjær, H. Thordal-Christensen, and J. Pons-Kühnemann, 2006, Arbuscular mycorrhiza reduces susceptibility of tomato to *Alternaria solani*: *Mycorrhiza*, v. 16, p. 413-419.
- Gallou, A., H. P. Lucero Mosquera, S. Cranenbrouck, J. P. Suarez, and S. Declerck, 2011, Mycorrhiza induced resistance in potato plantlets challenged by *Phytophthora infestans*: *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 76, p. 20-26.
- Garcia-Garrido, J. M., and J. A. Ocampo, 1988, Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on growth of tomato plants: *New Phytologist*, v. 110, p. 551-555.
- Garcia-Garrido, J. M., and J. A. Ocampo, 1989, Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*: *Soil Biology and Biochemistry*, v. 21, p. 165-167.
- García-Garrido, J., and J. A. Ocampo, 2002, Regulation of the plant defence response in arbuscular mycorrhizal symbiosis: *Journal of Experimental Botany*, v. 53, p. 1377.
- Germani, G., and C. Plenchette, 2005, Potential of *Crotalaria* species as green manure crops for the management of pathogenic nematodes and beneficial mycorrhizal fungi: *Plant and Soil*, v. 266, p. 333-342.
- Goicoechea N, Sánchez-Díaz M, Garmendia I, and Aguirreolea J, 2010, Review: Arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) as bioprotector agents against wilt induced by *Verticillium* spp. in pepper, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA).

- Graham, J., 1979, Survival of *Pseudomonas solanacearum* Race 3 in Plant Debris and in Latently Infected Potato Tubers: *Phytopathology*, v. 69.
- Graham, J., and A. B. Lloyd, 1978, An improved indicator plant method for the detection of *Pseudomonas solanacearum* race 3 in soil, *Plant disease*, p. 35-37.
- Graham, J. H., R. T. Leonard, and J. A. Menge, 1981, Membrane-Mediated Decrease in Root Exudation Responsible for Phosphorus Inhibition of Vesicular-Arbuscular Mycorrhiza Formation: *Plant Physiology*, v. 68.
- Grant, J. J., and G. J. Loake, 2000, Role of Reactive Oxygen Intermediates and Cognate Redox Signaling in Disease Resistance: *Plant Physiology*, v. 124.
- Halos, P. M., and R. A. Zorillas, 1979, Vesicular arbuscular mycorrhizae increase growth and yield of tomatoes and reduce infection by *Pseudomonas solanacearum*: *Phil. Agr.*, v. 62, p. 309-315.
- Hammond-Kosack, K. E., and J. D. G. Jones, 1996, Resistance Gene-Dependent Plant Defense Responses: *The Plant Cell*, v. 8, p. 1773-1791.
- Harrier, L. A., and C. A. Watson, 2004, The potential role of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi in the bioprotection of plants against soil-borne pathogens in organic and/or other sustainable farming systems: *Pest management science*, v. 60, p. 149-57.
- Hause, B., and S. Schaarschmidt, 2009, The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms: *Phytochemistry*, v. 70, p. 1589-1599.
- Hayward, A. C., 1991, Biology and Epidemiology of Bacterial Wilt Caused by *Pseudomonas Solanacearum*: *Annu. Rev. Phytopathol.* Annual Review of Phytopathology, v. 29, p. 65-87.
- He, L. Y., 1983, Characteristics of Strains of *Pseudomonas solanacearum* from China: *Plant Dis. Plant Disease*, v. 67.
- Hepper, C. M., 1981, Techniques for studying the infection of plants by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi under axenic conditions.: *New Phytologist*, v. 88, p. 641-647.
- Hernández-Sebastià, C., Y. Piché, and Y. Desjardins, 1999, Water relations of whole strawberry plantlets in vitro inoculated with *Glomus intraradices* in a tripartite culture system: *Plant Science Plant Science*, v. 143, p. 81-91.
- Hopkins, W. G., and C.-M. Évrard, 2003a, *Physiologie végétale*, v. Chapitre 5 : Les mycorhizes: Bruxelles, De Boeck.
- Hopkins, W. G., and C.-M. Évrard, 2003b, *Physiologie végétale*: Bruxelles, De Boeck.
- Jaizme-Vega, M. C., and J. Pinochet, 1997, Growth Response of Banana to Three Mycorrhizal Fungi in *Pratylenchus Goodeyi* Infested Soil: *NEMATROPICA*, v. 27, p. 69-76.
- Jaizme-Vega, M. C., P. Tenoury, J. Pinochet, and M. Jaumot, 1997, Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana: *Plant and Soil*, v. 196.
- Jung, S., A. Martinez-Medina, J. Lopez-Raez, and M. Pozo, 2012, Mycorrhiza-Induced Resistance and Priming of Plant Defenses: *Journal of Chemical Ecology*, v. 38, p. 651-664.
- Karagiannidis, N., F. Bletsos, and N. Stavropoulos, 2002, Effect of *Verticillium* wilt (*Verticillium dahliae* Kleb.) and mycorrhiza (*Glomus mosseae*) on root colonization, growth and nutrient uptake in tomato and eggplant seedlings: *Scientia Horticulturae*, v. 94, p. 145-156.
- Kelman, A., 1954, The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium: *Phytopathology*, v. 44, p. 693-695.
- Kloepper, J. W., and M. N. Schroth, Proc. of the 4th Internat. Conf. on Plant Pathogenic Bacter, Station de Pathologie Vegetale et Phytobacteriologie, INRA, p. 879-882.
- Koch, A. M., G. Kuhn, P. Fontanillas, L. Fumagalli, J. Goudet, I. R. Sanders, and C. B. Field, 2004, High Genetic Variability and Low Local Diversity in a Population of Arbuscular Mycorrhizal Fungi: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, p. 2369-2374.
- Lamb, C., and R. A. Dixon, 1997, The oxidative burst in plant disease resistance: *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, v. 48, p. 251-275.

- Larkin, R. P., and D. R. Fravel, 1999, Mechanisms of Action and Dose-Response Relationships Governing Biological Control of Fusarium Wilt of Tomato by Nonpathogenic Fusarium spp: *Phytopathology*, v. 89, p. 1152-61.
- lexicales, C. n. d. r. t. e., 2012, Définition Tellurique.
- Li, L., and J. C. Steffens, 2002, Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance: *Planta*, v. 215, p. 239-47.
- Lioussanne, L., 2010, Rôles des modifications de la microflore bactérienne et de l'exsudation racinaire de la tomate par la symbiose mycorhizienne dans le biocontrôle sur le *Phytophthora nicotianae*, Library and Archives Canada = Bibliothèque et Archives Canada, Ottawa.
- Liu, J., I. Maldonado-Mendoza, M. Lopez-Meyer, F. Cheung, C. D. Town, and M. J. Harrison, 2007, Arbuscular mycorrhizal symbiosis is accompanied by local and systemic alterations in gene expression and an increase in disease resistance in the shoots: *The Plant journal : for cell and molecular biology*, v. 50, p. 529-44.
- Louche-Tessandier, D., G. Samson, C. Hernandez-Sebastia, P. Chagvardieff, and Y. Desjardins, 1999, Importance of light and CO₂ on the effects of endomycorrhizal colonization on growth and photosynthesis of potato plantlets (*Solanum tuberosum*) in an in vitro tripartite system: *New Phytol New Phytologist*, v. 142, p. 539-550.
- Macdonald, R. M., 1981, Routine production of axenic vesicular-arbuscular mycorrhizas: *New Phytologist*, v. 89, p. 87-93.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, and T. D. Brock, 2007, Brock biologie des micro-organismes: Paris, Pearson Education France.
- Maherali, H., and J. N. Klironomos, 2007, Influence of Phylogeny on Fungal Community Assembly and Ecosystem Functioning: *Science Science*, v. 316, p. 1746-1748.
- Mandal, S., R. K. Das, and S. Mishra, 2011, Differential occurrence of oxidative burst and antioxidative mechanism in compatible and incompatible interactions of *Solanum lycopersicum* and *Ralstonia solanacearum*: *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 49, p. 117-123.
- Marschner, P., D. E. Crowley, and R. M. Higashi, 1997, Root exudation and physiological status of a root-colonizing fluorescent pseudomonad in mycorrhizal and non-mycorrhizal pepper (*Capsicum annuum* L.): *Plant and Soil*, v. 189, p. 11-20.
- martinique, C. d. a. d. l., 2007, Fiche technique : Tomate, http://www.martinique.chambagri.fr/fileadmin/ca972/service/Fiches_techniques/Tomate_07.pdf.
- Matthias, C. R., and M. M. T. The University of Montana, 2003, Controls on the production, incorporation and decomposition of glomalin - a novel fungal soil protein important to soil carbon: United States.
- Meixner, C., J. Ludwig-Müller, O. Miersch, P. Gresshoff, C. Staehelin, and H. Vierheilig, 2005, Lack of mycorrhizal autoregulation and phytohormonal changes in the supernodulating soybean mutant nts1007: *Planta*, v. 222, p. 709-715.
- Michel, V., H. Ahmed, and A. Dutheil, 2007, La biofumigation, une méthode de lutte contre les maladies du sol, *Revue suisse de viticulture, arboriculture et horticulture*, p. 145-150.
- Michel, V. V., G. L. Hartman, and D. J. Midmore, 1996, Effect of Previous Crop on Soil Populations of *Burkholderia solanacearum*, Bacterial Wilt, and Yield of-Tomatoes in Taiwan: *Plant disease.*, v. 80, p. 1367.
- Miller, R. M., J. D. Jastrow, and D. R. Reinhardt, 1995, External hyphal production of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in pasture and tallgrass prairie communities: *Oecologia Oecologia*, v. 103, p. 17-23.
- Mittler, R., 2002, Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance: *Trends in Plant Science*, v. 7, p. 405-410.
- Morandi, D., 1996, Occurrence of phytoalexins and phenolic compounds in endomycorrhizal interactions, and their potential role in biological control: *Plant and soil.*, v. 185, p. 241.
- Morris, C. E., and J. M. Monier, 2003, The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria: *Annual review of phytopathology*, v. 41, p. 429-53.

- Nehl, D. B., and S. J. Allen, 1997, Deleterious rhizosphere bacteria: an integrating perspective: *APPLIED SOIL ECOLOGY*, v. 5, p. 1-20.
- Newman, E. I., 1988, Mycorrhizal links between plants their functioning and ecological significance: *Adv. Ecol. Res.*, v. 18, p. 243-271.
- Nielsen, J. S., E. J. Jøner, S. Declerck, S. Olsson, and I. Jakobsen, 2002, Phospho-imaging as a tool for visualization and noninvasive measurement of P transport dynamics in arbuscular mycorrhizas: *New Phytologist*, v. 154, p. 809-819.
- Parniske, M., 2008, Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses: *Nat Rev Micro Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 763-775.
- Pascal, F., and A. Trigalet, 1994, Lutte biologique contre le flétrissement bactérien des Solanacées à l'aide de mutants Hrp[-] de *Pseudomonas solanacearum*, Université de Paris 11, Orsay, FRANCE (Université de soutenance), Travaux Universitaires - Thèse nouveau doctorat, p. 218.
- Pieterse, C. M. J., A. Leon-Reyes, S. Van Der Ent, and S. C. M. Van Wees, 2009, Networking by small-molecule hormones in plant immunity: *Nat. Chem. Biol. Nature Chemical Biology*, v. 5, p. 308-316.
- Pons, F., V. Gianinazzi-Pearson, and S. Gianinazzi, 1982, Synthèse in vitro des endomycorhizes éricoides et VA: complément à la micropropagation, Les colloques de l'INRA, p. 345-349.
- Pozo, M., C. Azcón-Aguila, E. Dumas-Gaudot, and J. Barea, 1998, Chitosanase and chitinase activities in tomato roots during interactions with arbuscular mycorrhizal fungi or *Phytophthora parasitica*: *Journal of Experimental Botany*, v. 49, p. 1729-1739.
- Pozo, M. J., and C. Azcón-Aguilar, 2007, Unraveling mycorrhiza-induced resistance: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 10, p. 393-398.
- Pozo, M. J., C. Cordier, E. Dumas-Gaudot, S. Gianinazzi, J. M. Barea, and C. Azcón-Aguilar, 2002, Localized versus systemic effect of arbuscular mycorrhizal fungi on defence responses to *Phytophthora* infection in tomato plants: *Journal of experimental botany*, v. 53, p. 525-34.
- Pozo, M. J., E. Dumas-Gaudot, S. Slezack, C. Cordier, A. Asselin, S. Gianinazzi, V. Gianinazzi-Pearson, C. Azcón-Aguilar, and J. M. Barea, 1996, Induction of new chitinase isoforms in tomato roots during interactions with *Glomus mosseae* and/or *Phytophthora nicotianae* var *parasitica*: *Agronomie.*, v. 16, p. 689.
- Pozo, M. J., S. C. Jung, J. A. López-Ráez, and C. Azcón-Aguilar, 2010, Impact of Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis on Plant Response to Biotic Stress: The Role of Plant Defence Mechanisms
- Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function, in H. Koltai, and Y. Kapulnik, eds., Springer Netherlands, p. 193-207.
- Pozo, M. J., L. C. Van Loon, and C. M. J. Pieterse, 2004, Jasmonates - Signals in plant-microbe interactions: *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 23, p. 211-222.
- Pozo, M. J., A. Verhage, J. García-Andrade, J. M. García, and C. Azcón-Aguilar, 2009, Priming Plant Defence Against Pathogens by Arbuscular Mycorrhizal Fungi
- Mycorrhizas - Functional Processes and Ecological Impact, in C. Azcón-Aguilar, J. M. Barea, S. Gianinazzi, and V. Gianinazzi-Pearson, eds., Springer Berlin Heidelberg, p. 123-135.
- Quezado-Soares, A. M., 1997, Breeding for bacterial-wilt resistance of eggplant in Brazil: *Capsicum & Eggplant Newsletter*, Turin, p. 118-119.
- Rajapakse, S., D. Zuberer, and J. Miller, 1989, Influence of phosphorus level on VA Mycorrhizal colonization and growth of cowpea cultivars: *Plant and Soil*, v. 114, p. 45-52.
- Redecker, D., J. B. Morton, and T. D. Bruns, 2000, Ancestral lineages of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomales): *Molecular phylogenetics and evolution*, v. 14, p. 276-84.
- Remy, W., T. N. Taylor, H. Hass, and H. Kerp, 1994, Four Hundred-Million-Year-Old Vesicular Arbuscular Mycorrhizae: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 91, p. 11841-11843.

- Ren, L., Y. Lou, K. Sakamoto, K. Inubushi, Y. Amemiya, Q. Shen, and G. Xu, 2010, Effects of Arbuscular Mycorrhizal Colonization on Microbial Community in Rhizosphere Soil and Fusarium Wilt Disease in Tomato: Communications in Soil Science and Plant Analysis, v. 41, p. 1399-1410.
- Rice, E. L., 1984, Allelopathy: Orlando, Academic Press.
- Rosendahl, S., and E. H. Stukenbrock, 2004, Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi in undisturbed vegetation revealed by analyses of LSU rDNA sequences: Molecular Ecology, v. 13, p. 3179-3186.
- Schellenbaum, L., J. Müller, T. Boller, A. Wiemken, and H. Schüepp, 1998, Effects of Drought on Non-Mycorrhizal and Mycorrhizal Maize: Changes in the Pools of Non-Structural Carbohydrates, in the Activities of Invertase and Trehalase, and in the Pools of Amino Acids and Imino Acids: New Phytologist, v. 138, p. 59-66.
- Schwob, I., M. Ducher, and A. Coudret, 1999, Effects of climatic factors on native arbuscular mycorrhizae and Meloidogyne exigua in a Brazilian rubber tree (Hevea brasiliensis) plantation: Plant Pathology, v. 48, p. 19.
- Schüßler, A., and C. Walker, 29 mai, 2012, Glomeromycota Species List, http://www.lrz.de/~schuessler/amphylo/amphylo_species.html.
- Seassau, C., G. Dechamp-Guillaume, E. Mestries, and P. Debaeke, 2010, Nitrogen and water management can limit premature ripening of sunflower induced by Phoma macdonaldii: Field Crops Research Field Crops Research, v. 115, p. 99-106.
- Sharma, J. P., and S. Kumar, 2004, Effect of crop rotation on population dynamics of Ralstonia solanacearum in tomato wilt sick soil: INDIAN PHYTOPATHOLOGY, v. 57, p. 80-81.
- Sikes, B. A., K. Cottenie, and J. N. Klironomos, 2009, Plant and fungal identity determines pathogen protection of plant roots by arbuscular mycorrhizas: Journal of Ecology, v. 97, p. 1274-1280.
- Smith, Yabuuchi, and e. al., 1999, PROCEDURE DE TEST POUR DIAGNOSTIQUER, DETECTER ET IDENTIFIER RALSTONIA SOLANACEARUM, Journal Officiel, Arrêté du 11 février 1999 relatif à la lutte contre Ralstonia solanacearum.
- Smith, G., 1988, The role of phosphorus nutrition in interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi with soilborne nematodes and fungi, Phytopathology, p. 371-374.
- Smith, S. E., and D. J. Read, 2008, Mycorrhizal symbiosis, Amsterdam; Boston, Academic Press.
- Smith, S. E., D. J. Read, and J. L. Harley, 1997, Mycorrhizal symbiosis: San Diego, Calif., Academic Press.
- Solaiman, M. Z., and M. Saito, 1997, Use of Sugars by Intraradical Hyphae of Arbuscular Mycorrhizal Fungi Revealed by Radiorespirometry: New Phytologist, v. 136, p. 533-538.
- St-Arnaud, M., C. Hamel, B. Vimard, C. Caron, and J. A. Fortin, 1996, Enhanced hyphal growth and spore production of the arbuscular mycorrhizal fungus glomus intraradices in an in vitro system in the absence of host roots: Mycological research., v. 100, p. 328.
- St-Arnaud, M., C. Hamel, B. Vimard, M. Caron, and J. A. Fortin, 1997, Inhibition of Fusarium oxysporum f.sp. dianthi in the non-VAM species Dianthus caryophyllus by co-culture with Tagetes patula companion plants colonized by Glomus intraradices: CANADIAN JOURNAL OF BOTANY, v. 75, p. 998-1005.
- Strullu, D.-G., and C. Romand, 1986, Méthode d'obtention d'endomycorhizes à vésicules et arbuscules en conditions axéniques, v. 303: Paris, FRANCE, Elsevier.
- Stumpe, M., J. G. Carsjens, I. Stenzel, C. Göbel, I. Lang, K. Pawlowski, B. Hause, and I. Feussner, 2005, Lipid metabolism in arbuscular mycorrhizal roots of Medicago truncatula: Phytochemistry, v. 66, p. 781-791.
- Tahat, M. M., O. Radaah, S. Kamaruzaman, J. Kadir, and N. H. Masdek, 2008, Role of plant host in determining differential responses to ralstonia solanacearum and glomus mosseae: Plant Pathol. J. Plant Pathology Journal, v. 7, p. 140-147.
- Tahat, M. M., K. Sijam, and R. Othman, 2010, The Role of Tomato and Corn Root Exudates on Glomus mosseae Spores Germination and Ralstonia solanacearum Growth in vitro: International J. of Plant Pathology International Journal of Plant Pathology, v. 1, p. 1-12.

- Tans-Kersten, J., H. Huang, and C. Allen, 2001, *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato: *Journal of bacteriology*, v. 183, p. 3597-605.
- Taylor, B. L., I. B. Zhulin, and M. S. Johnson, 1999, Aerotaxis and other energy-sensing behavior in bacteria: *Annual review of microbiology*, v. 53, p. 103-28.
- Tepfer, D., 1989, Ri T-DNA from *Agrobacterium rhizogenes*: a source of genes having applications in rhizosphere biology and plant development, ecology and evolution, in T. Kosuge, and E. W. Nester, eds., *Plant Microbe Interaction*, New York, Graham Hill, p. 294-342.
- Terblanche, J. Dina, and U. o. t. Free, 2007, Biological control of bacteria wilt in tobacco caused by *Ralstonia solanacearum*.
- Trotta, A., G. C. Varese, E. Gnani, A. Fusconi, S. Sampo, and G. Berta, 1996, Interactions between the soilborne root pathogen *Phytophthora nicotianae* var.: *parasitica* and the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* in tomato plants: *Plant and soil*, v. 185, p. 199.
- Trouvelot, A., J. L. Kough, and V. Gianinazzi-Pearson, 1986, Mesure du taux de mycorhization VA d'un système racinaire. Recherches et méthodes d'estimation ayant une signification fonctionnelle *Aspects physiologiques et génétiques des mycorhizes*, INRA, p. 7-221.
- van der Heijden, M. G. A., Bardgett, R. D., van Straalen, and N. M., 2008, The unseen majority: soil microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems: *Ecology Letters*, v. 11, p. pp. 296-310.
- van Elsas, J. D., P. Kastelein, P. M. de Vries, and L. S. van Overbeek, 2001, Effects of ecological factors on the survival and physiology of *Ralstonia solanacearum* bv. 2 in irrigation water: *Canadian journal of microbiology*, v. 47, p. 842-54.
- van Elsas, J. D., P. Kastelein, P. van Bekkum, J. M. van der Wolf, P. M. de Vries, and L. S. van Overbeek, 2000, Survival of *Ralstonia solanacearum* Biovar 2, the Causative Agent of Potato Brown Rot, in *Field and Microcosm Soils in Temperate Climates: Phytopathology*, v. 90, p. 1358-66.
- Van Wees, S. C. M., S. Van der Ent, and C. M. J. Pieterse, 2008, Plant immune responses triggered by beneficial microbes: *Current Opinion in Plant Biology*, v. 11, p. 443-448.
- Vandenkoornhuyse, P., K. P. Ridgway, I. J. Watson, A. H. Fitter, and J. P. W. Young, 2003, Co-existing grass species have distinctive arbuscular mycorrhizal communities: *Molecular Ecology*, v. 12, p. 3085-3095.
- Violi, H., K. Treseder, J. Menge, S. Wright, and C. Lovatt, 2007, Density dependence and interspecific interactions between arbuscular mycorrhizal fungi mediated plant growth, glomalin production, and sporulation: *Canadian Journal of Botany*, v. 85, p. 63-75.
- Voets, L., I. E. de la Providencia, and S. Declerck, 2006, Glomeraceae and Gigasporaceae Differ in Their Ability to Form Hyphal Networks: *New Phytologist*, v. 172, p. 185-188.
- Voets, L., I. E. De La Providencia, K. Fernandez, M. Ijdo, S. Declerck, and S. Cranenbrouck, 2009, Extraradical mycelium network of arbuscular mycorrhizal fungi allows fast colonization of seedlings under in vitro conditions: *Mycorrhiza Mycorrhiza*, v. 19, p. 347-356.
- Voets, L., H. Dupré de Boulois, L. Renard, D.-G. Strullu, and S. Declerck, 2005, Development of an autotrophic culture system for the in vitro mycorrhization of potato plantlets: *FEMS Microbiology Letters*, v. 248, p. 111-118.
- Wasternack, C., and B. Hause, 2002, Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development: *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, v. 72, p. 165-221.
- Wicker, E., L. Grassart, R. Coranson-Beaudu, D. Mian, C. Guilbaud, M. Fegan, and P. Prior, 2007, *Ralstonia solanacearum* Strains from Martinique (French West Indies) Exhibiting a New Pathogenic Potential: *Applied and Environmental Microbiology Applied and Environmental Microbiology*, v. 73, p. 6790-6801.
- Wicker, E., L. Grassart, R. Coranson-Beaudu, D. Mian, and P. Prior, 2009, Epidemiological evidence for the emergence of a new pathogenic variant of *Ralstonia solanacearum* in Martinique (French West Indies): *Plant Pathology*, v. 58, p. 853-861.

- Wright, S. F., J. L. Starr, and I. C. Paltineanu, 1999, Changes in Aggregate Stability and Concentration of Glomalin during Tillage Management Transition: Soil Science Society of America Journal, v. 63.
- Yao, J., and C. Allen, 2006, Chemotaxis Is Required for Virulence and Competitive Fitness of the Bacterial Wilt Pathogen *Ralstonia solanacearum*: Journal of Bacteriology Journal of Bacteriology, v. 188, p. 3697-3708.
- Yao, J., and C. Allen, 2007, The Plant Pathogen *Ralstonia solanacearum* Needs Aerotaxis for Normal Biofilm Formation and Interactions with Its Tomato Host: Journal of Bacteriology Journal of Bacteriology, v. 189, p. 6415-6424.
- Young, Dye, and Wilkie, 27/06/2012, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, http://ephytia.inra.fr/tomate/tomate_utilisateur/index_appli.php?portail=LEGUMES&produit=tomate&main=2&ssrub1=61&ssrub2=73&ssrub3=75&ssrub4=76&id_fiche=53.
- Yu, J. Q., 1999, Allelopathic Suppression of *Pseudomonas solanacearum* Infection of Tomato (*Lycopersicon esculentum*) in a Tomato-Chinese Chive (*Allium tuberosum*) Intercropping System: Journal of Chemical Ecology, v. 25, p. 2409-2417.
- Zhu, H. H., and Q. Yao, 2004, Localized and Systemic Increase of Phenols in Tomato Roots Induced by *Glomus versiforme* Inhibits *Ralstonia solanacearum*: Journal of Phytopathology, v. 152, p. 537-542.